

Aus der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin / Zentrallabor
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. W. Herrmann

Hyperhomocysteinämie
und die myokardiale Expression von
Brain Natriuretic Peptide
in Ratten

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes

2007

vorgelegt von
Omid Taban-Shomal
geboren am 04.06.1983
in Homburg

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
	Summary	2
II	Einleitung	3
1	Definition	3
2	Einteilung, Pathomechanismus und Klinik der CHI	3
3	Epidemiologie	8
4	Klinische und experimentelle Datenlage der HHCY im Rahmen der CHI	10
5	HCY-Stoffwechsel	16
6	Brain Natriuretic Peptide (BNP)	18
7	Ziel der Arbeit	20
III	Material und Methodik	21
1	Studiendesign	21
2	Tiermodell	22
3	Diäten	23
4	Narkoseverfahren	24
5	Analysen	25
5.1	Blutdruck und Herzfrequenz	25
5.2	Erhebung der Organparameter	25
5.2.1	Präanalytik: Asservierung der Organe	25
a)	Rahmenbedingungen	25
b)	Organentnahme	26
5.2.2	Analytik	30
5.3	Morphometrie	32
5.3.1	Präanalytik	32
a)	Herstellung des Gewebeschnittes	32
b)	Mastzellfärbung	32
c)	Kollagenfärbung	34

5.3.2	Analytik	35
a)	Mastzellen	35
b)	Interstitielles und perivaskuläres Kollagen	36
5.4	Biochemische Blutanalysen	36
5.4.1	Präanalytik: Blutentnahme	36
5.4.2	Analytik	37
a)	VitB12 und Folsäure	37
b)	Kreatinin	37
c)	Homocystein	38
d)	BNP	38
5.5	Quantitative Proteinanalysen	39
6	Superfusions-Experiment	40
7	Statistik	42
IV	Ergebnisse	43
1	Ausgangsscharakteristika	43
2	Nahrungsaufnahme und Körpergewicht	44
3	Blutdruck, Herzfrequenz und Kreatinin	45
4	Homocystein- und B-Vitamin- Plasmakonzentration	46
5	BNP	49
6	Organparameter	51
a)	Ventrikelgewicht	51
b)	Feuchtgewicht der Lungen	53
7	Histomorphometrische Daten	55
a)	Interstitielles und perivaskuläres Kollagen	55
b)	Mastzellen	57
8	Superfusionsdaten	58
V	Diskussion	59
1	Tiermodell	59
2	BNP	61
3	Myokardiales Remodelling	65
4	Limitationen	67
5	Pathomechanismen	69

VI	Schlussfolgerung	72
VII	Literaturverzeichnis	73
VIII	Abkürzungsverzeichnis	84
IX	Eigene Publikationen	86
X	Danksagung	87
XI	Lebenslauf	89
XII	Anhang	91

I Zusammenfassung

Hintergrund: Aktuelle Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Hyperhomocysteinämie und einer gestörten linksventrikulären Funktion sowie dem klinischen Schweregrad der chronischen Herzinsuffizienz auf. Brain Natriuretic Peptide (BNP) repräsentiert einen modernen Marker der chronischen Herzinsuffizienz, der bei gesteigerter Wandspannung erhöht ist. Es wird vermutet, dass eine Hyperhomocysteinämie die myokardiale BNP-Expression stimuliert und ein pathologisches linksventrikuläres Remodelling hervorruft. **Material und Methodik:** 50 Ratten wurden randomisiert auf 5 Gruppen aufgeteilt: Met, Homo 1%, Homo 2%, Ko1 und Ko2. Ko1 und Ko2 (Kontrollen) erhielten eine Standarddiät. Met, Homo 1% und Homo 2% wurden mit derselben Diät, ergänzt durch verschiedene Dosen von Methionin und Homocystin, gefüttert (Met: 2,4% Methionin; Homo 1%: 1% Homocystin; Homo 2%: 2% Homocystin). Nach 12 Wochen wurden sowohl Gesamt-Homocystein sowie Plasma- und Gewebe-BNP gemessen als auch histomorphometrische Analysen durchgeführt. **Ergebnisse:** Alle Tiere hatten ein vergleichbares Basis-Körpergewicht und Gesamt-Homocystein (234 ± 26 g; $4,7 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/L}$). Nach 12 Wochen Behandlung stieg das Gesamt-Homocystein in der Met-, Homo 1%- und Homo 2%-Gruppe signifikant an ($27,3 \pm 8,8$, $40,6 \pm 7,0$ und $54,0 \pm 46,0$ $\mu\text{mol/L}$), während es in den Kontroll-Gruppen Ko1 und Ko2 unverändert niedrig blieb. Das Serum-BNP stieg bei einem der zehn Methionin-behandelten Tiere sowie bei jeweils drei von zehn der Homo 1%- und Homo 2%-Tiere an. Die mediane [25.-75. Perzentile] BNP- Myokardgewebekonzentration in den Homo 1%- und Homo 2%-Gruppen waren ca. 55 % höher als in den entsprechenden Kontrollen (Homo 1% vs. Ko 1: $338[262-410]$ vs. $225[186-263]$ pg/mg Protein; $p=0,05$, Homo 2% vs. Ko 2: $308[192-429]$ vs. $179[107-261]$ pg/mg Protein; $p=0,12$). Die BNP-Expression in der Met- Gruppe war gegenüber den Kontrollen nicht different ($225[186-263]$ vs. $200[159-235]$ pg/mg Protein; $p=0,32$). Sowohl der prozentuale Anteil an perivaskulärem und interstitiellem Kollagen als auch die Mastzellinfiltration waren in allen Gruppen vergleichbar. **Schlussfolgerung:** Eine dreimonatige intermediäre Hyperhomocysteinämie induziert eine signifikante Stimulation der BNP-Expression, die nicht von einem pathologischen Remodelling des Myokards begleitet ist.

Summary

Background : Recent studies showed an association of hyperhomocysteinemia (HHCY) to impaired left ventricular function and clinical class in chronic heart failure (CHF) patients. Brain natriuretic peptide (BNP) represents a modern marker in CHF that is elevated following an increase in wall stress. We hypothesized that HHCY stimulates myocardial BNP-expression and induces adverse left ventricular remodeling. **Material and Methods:** 50 rats were randomized into 5 groups: Met, HCY1, HCY2, Co1 and Co2. Co1 and Co2 (controls) received a standard diet. Met, HCY1 and HCY2 were fed the same diet supplemented with different doses of methionine and homocystine (Met: 2.4% methionine; HCY1: 1% homocystine; HCY2: 2% homocystine). After 12 weeks, measurement of total plasma-homocysteine (tHCY), BNP in plasma and tissue as well as histomorphometric analyses were performed. **Results:** All animals had comparable baseline body weight and tHCY (234 ± 26 g; 4.7 ± 1.7 $\mu\text{mol/L}$). After 12 weeks of treatment tHCY increased in Met, HCY1 and HCY2 (27.3 ± 8.8 , 40.6 ± 7.0 and 54.0 ± 46.0 $\mu\text{mol/L}$), and remained unchanged in Co1 and Co2. Serum BNP significantly increased in 1/10 animals in Met, in 3/10 animals in HCY1 and in 3/10 animals in HCY2. Median (25.-75.percentile) BNP tissue levels in HCY1 (225[186-263] vs. 338[262-410] pg/mg protein; $p=0.05$) and HCY2 (308[192-429] vs. 179[107-261] pg/mg protein, $p=0.12$) were 55% higher than in the corresponding controls. In Met BNP-expression was comparable to controls (200[159-235] vs. 225[186-263] pg/mg protein; $p=0.32$). The percentage of perivascular and interstitial collagen as well as mast cell infiltration were comparable in all groups, indicating no adverse cardiac remodeling in Met, HCY1 and HCY2. **Conclusion:** Three months of intermediate HHCY induced a significant stimulation of cardiac BNP expression that was not accompanied by an adverse cardiac remodeling.

II Einleitung

1 Definition

Die Herzinsuffizienz (HI) bezeichnet eine krankhafte Pumpschwäche des Herzens, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist, das für den Organismus notwendige Herzzeitvolumen zu fördern. Durch die daraus resultierende Minderperfusion der Gewebe und der damit unzureichenden Sauerstoffversorgung kann der Gewebestoffwechsel nicht mehr sichergestellt werden. Darüber hinaus kann der venöse Rückfluss zum Herzen gestört sein. Die klinischen Leitsymptome der Herzinsuffizienz sind verminderte körperliche Belastbarkeit, Dyspnoe, Müdigkeit und eine vermehrte Flüssigkeitsretention (51).

2 Einteilung, Pathomechanismus und Klinik der Chronischen Herzinsuffizienz

Die HI kann nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Zum einen unterscheidet man zwischen der hauptsächlich betroffenen Herzkammer und unterteilt die HI in Linksherz-, Rechtsherz-, und biventrikuläre Globalinsuffizienz (61). Nach dem zeitlichen Verlauf differenziert man eine akute und eine chronische Form. Während die akute HI sich im Verlauf von Stunden oder Tagen entwickelt, entsteht die chronische HI (CHI) über Monate bzw. Jahre. Eine akute HI kann durch myokardiales Pumpversagen, durch Perikardtamponade, akut auftretende Shuntvitien oder durch tachykarde und bradykarde Herzrhythmusstörungen entstehen. Bei der CHI wird eine kompensierte von einer dekompenzierten Form unterschieden. Bei der letzteren Form versagen die physiologischen Kompensationsmechanismen, was bereits unter normaler Belastung zum Auftreten von Symptomen führt (46).

Nach den im Vordergrund stehenden pathogenetischen Merkmalen unterscheidet man ein Vorwärtsversagen (forward failure), bei dem die systemische

Blutversorgung durch ein Pumpversagen des Herzens vermindert ist, und ein Rückwärtsversagen (back failure), bei dem es zum Rückstau von Blut in das Niederdrucksystem kommt (104). Beim Vorwärtsversagen des Herzens kann zusätzlich zwischen einem low-output-failure und einem high-output-failure unterschieden werden. Beim low-output-failure kann das Herz infolge einer Kontraktionsstörung das physiologische Herzzeitvolumen des Körpers nicht mehr decken. Das seltenere high-output-failure zeichnet sich durch ein zunächst gesundes Herz aus, das infolge eines pathologisch gesteigerten zirkulatorischen Bedarfs, wie z.B. bei einer Sepsis oder Hypothyreose, das HZV nicht mehr zu decken vermag. (104).

Bei einem low-output-failure unterscheidet man zwischen systolischer und diastolischer Ventrikelfunktionsstörung (61). Die systolische HI ist durch eine Kontraktionsstörung des Myokards gekennzeichnet und geht, meist aufgrund einer erhöhten Nachlast, mit einer erhöhten Ventrikelwandspannung einher. Während am gesunden Herzen eine akut erhöhte Wandspannung aufgrund des Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Längen-Beziehung), des Bowditch-Effektes (Kraft-Frequenz-Beziehung) und einer Sympathiko-adrenergen Aktivierung zu einer Zunahme der Kontraktionskraft bzw. der Auswurfleistung führt, sind diese Kompensationsmechanismen beim chronisch belasteten Herzen in ihrer Wirksamkeit reduziert. Dies führt letztlich zu einer erniedrigten linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) und einer Abnahme des Herzzeitvolumen (HZV). Das erniedrigte HZV führt sowohl zu einer erhöhten Vorlast (Preload) als auch zu einer erhöhten Nachlast (Afterload). Das erniedrigte HZV bedingt eine reduzierte Perfusion der Peripherie, was eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus sowie eine ADH-Freisetzung zur Folge hat. Während die Sympathikusaktivierung und die vermehrte Angiotensin-II-Sekretion durch die Steigerung des peripheren Widerstandes zu einer Nachlasterhöhung führen, verursachen ADH und Aldosteron durch Wasser- bzw. Salzretention eine Vorlasterhöhung. Diese Kompensationsmechanismen sind zwar anfangs hilfreich, münden aber im weiteren Verlauf in einen Circulus vitiosus (61). Nachlast- und Vorlasterhöhung kombiniert bewirken eine Dehnung von Vorhöfen und Kammern, was zur Freisetzung der kardialen Gewebshormone Atrial Natriuretic Peptide (ANP) und Brain Natriuretic Peptide (BNP) führt, die dem RAAS und dem ADH durch vasodilatatorische und natriuretisch-diuretische Effekte entgegenwirken (46). Anders

stellen sich die Dinge bei der diastolischen Ventrikelfunktionsstörung dar: Hierbei kommt es zur Behinderung der Ventrikelfüllung. Pathophysiologisch unterscheidet man zwischen einer frühdiastolischen Relaxationsstörung und einer zunehmenden spätdiastolischen Dehnbarkeitsstörung (Compliancestörung), so dass die Diastole verlängert, verlangsamt oder inkomplett abläuft (6;138). Ursache ist meist eine linksventrikuläre Hypertrophie, die häufig Folge einer arteriellen Hypertonie ist. Alternativ findet man oft auch eine Myokardischämie, die sich auf der Basis einer vorbestehenden koronaren Herzkrankheit entwickelt. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Störung der Wiederaufnahme von Kalzium durch Kalzium-ATPasen (SERCA-2a), was zu einer Relaxationsstörung führt. Zusätzlich kommt es im Rahmen der CHI zu einem fibrotischen Umbau der extrazellulären Matrix, der zu einer reduzierten Compliance führt (18).

Klinisch führt die akute HI zu einem abrupten Abfall des Herzzeitvolumen (HZV) im Sinne eines akuten Vorwärtsversagens mit den Symptomen der arteriellen Hypotonie und Reflextachykardie sowie zu einem Rückwärtsversagen mit akuter pulmonaler Stauung. Typische Symptome hierfür sind Tachypnoe, pulmonale Rasselgeräusche, schaumiges Sputum und Zyanose (51). Die CHI äußert sich durch eine systolische Funktionsstörung, die mit einer inadäquaten Förderleistung einhergeht, und ist oft begleitet von einer diastolischen Funktionsstörung, die zur Behinderung der Ventrikelfüllung aufgrund einer eingeschränkten Dehnbarkeit des Myokards führt. Dies führt zu einem Rückstau in das Niederdrucksystem. Der gestörte Abfluss ist klinisch durch eine Lebervenenstauung und obere Einflusstauung gekennzeichnet. Außerdem kommt es im Rahmen der CHI zu einer Herzvergrößerung, sympatikotoner Überaktivität, Pleuraergüssen, Ödemen, Nykturie, Kurzatmigkeit und Belastungsdyspnoe (51;104).

Die Einteilung des Schweregrades der HI erfolgt auf Basis der klinischen Symptomatik. Dabei existieren zwei gängige Einteilungen, die NYHA- und die ABCD-Einteilung. Die Stadien und deren Definition sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die NYHA-Klassifikation richtet sich nach den subjektiven Beschwerden entsprechend der Leistungsfähigkeit des Patienten. Während im NYHA-Stadium I völlige Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastung vorliegt, ist das Stadium II bei normaler Belastung durch geringe Einschränkungen der körperlichen Leistungsfähigkeit gekennzeichnet, die sich beim Laufen unter anderem als Dyspnoe

manifestiert. Im Stadium III liegt bereits eine starke Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit vor, die sich durch entsprechende Symptome bereits bei normaler Belastung (Treppensteigen) äußert. Das Stadium IV zeichnet sich durch Ruhedyspnoe und eine stark eingeschränkte Leistungsfähigkeit aus (46;51).

Tabelle 1: Definition der NYHA- und ABCD-Stadien.

NYHA*- Stadium	Subjektive Beschwerden bei HI
I	Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastbarkeit
II	Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
III	Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung
IV	Beschwerden in Ruhe

ABCD- Stadien	Einteilung der HI nach AHA**
A	Patienten ohne Symptome einer HI und ohne strukturelle Herzerkrankung, aber mit Risikofaktoren für eine HI
B	Patienten ohne Symptome einer HI, aber mit struktureller Herzerkrankung, die eng mit der Entstehung einer HI assoziiert sind
C	Strukturelle Herzschäden in Verbindung mit Symptomen einer Herzinsuffizienz
D	Terminale Herzinsuffizienz mit HI-Symptomen und fortgeschrittener struktureller Herzerkrankung

*New York Heart Association (NYHA)

**American Heart Association (AHA)

Gemäß der Leitlinie der Kommission für klinische Kardiologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie sind die Symptome der Herzinsuffizienz und die Echokardiographie maßgebend in der Diagnostik der CHI (51). Die Symptome der CHI werden nach den Framingham-Kriterien in 1. und 2. Ordnung eingeteilt (s. Tabelle 2) (51;61).

Tabelle 2 : Framingham-Kriterien für die klinische Diagnose einer Herzinsuffizienz.

Kriterien 1. Ordnung:

Paroxysmal nächtliche Dyspnoe oder Orthopnoe
Halsvenenstauung
Pulmonale Rasselgeräusche
Kardiomegalie
Akutes Lungenödem
3. Herzton
Erhöhter zentraler Venendruck ($> 16 \text{ cm H}_2\text{O}$)
Zirkulationszeit $\geq 25 \text{ s}$
Hepatojugulärer Reflux
Gewichtsabnahme über 4,5 kg in 5 Tagen unter Herzinsuffizienztherapie

Kriterien 2. Ordnung:

Unterschenkelödeme
Nächtlicher Husten
Belastungsdyspnoe
Hepatomegalie
Pleuraergüsse
Tachykardie (Herzfrequenz ≥ 120 pro Minute)
Vitalkapazität vermindert auf weniger als 1/3 des Maximums

Unter den nichtinvasiven apparativen Verfahren kommt der Echokardiographie die größte praktische Bedeutung bei der Diagnostik einer kardialen Dysfunktion zu. Mittels transthorakaler Echokardiographie können die globale und regionale systolische Funktion, die Myokarddicke, eine diastolische Dysfunktion und Klappenvitien beurteilt werden (51). Unterstützend kommen weitere Untersuchungsverfahren, wie z.B. die Herzkatheteruntersuchung, die Röntgen-Thorax-Aufnahme sowie die Bestimmung der Plasmakonzentration von BNP oder NT-proBNP zum Einsatz. Eine Herzkatheteruntersuchung ist bei Patienten mit Herzinsuffizienz zur Klärung der zugrunde liegenden Ätiologie indiziert, nicht jedoch zur Dokumentation der Herzinsuffizienz (51). Zudem sollte eine Koronarangiographie bei Patienten mit Angina pectoris oder anderen Zeichen einer Myokardischämie sowie bei Patienten mit unklarer Dekompensation durchgeführt werden. Eine Endomyokardbiopsie ist nur bei ausgewählten Patienten mit unklarer nicht ischämischer Herzinsuffizienz sinnvoll und hilfreich zur Klärung der Ätiologie (51). Eine Röntgen-Thorax-Aufnahme kann zum Nachweis von Pleuraergüssen, einer

pulmonalen Stauung oder Kardiomegalie durchgeführt werden. Ein unauffälliger Befund schließt eine Herzinsuffizienz jedoch nicht aus. Zur Beurteilung der Herzgröße (Kardiomegalie: Herz-Thorax-Durchmesser $>0,50$) hat die Röntgen-Thorax-Aufnahme nur einen orientierenden Stellenwert (51). Die Bestimmung der Plasmakonzentration von BNP oder NT-proBNP kann für die Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz hilfreich sein. Niedrig normale Konzentrationen von BNP/NT-proBNP bei unbehandelten Patienten machen eine HI als Ursache der Symptomatik unwahrscheinlich (51). Der besondere Stellenwert einer BNP/NT-proBNP-Bestimmung in der klinischen Routine liegt derzeit in einem Ausschluss einer relevanten kardialen Dysfunktion bei unklarer Dyspnoe in der Notfallmedizin (93). Bei normalen Konzentrationen ist eine weitere kardiologische Abklärung, speziell eine Echokardiographie, in dieser Situation in der Regel nicht erforderlich. Ergänzend kann eine BNP/NT-proBNP-Bestimmung im Einzelfall zur Beurteilung der klinischen Situation und Medikamenteneinstellung ergänzend hilfreich sein (51). Die Dosierung der Therapie sollte aufgrund der derzeit noch unzureichenden Datenlage nicht anhand der BNP/NT-proBNP-Spiegel gesteuert werden (51).

3 Epidemiologie

Der stetig ansteigende Altersdurchschnitt in den industriellen Ländern und die therapeutischen Fortschritte in der Versorgung von Herzpatienten führen zu einem ständigen Zuwachs an CHI-Patienten und damit verbunden zu einer enormen Belastung des Gesundheitswesens (10;23;34;59;84;117).

Eine groß angelegte epidemiologische Studie, die Rotterdam-Studie, ermittelte eine Prävalenz der CHI von 3,9 % (91) in der Bevölkerungsgruppe > 55 Jahre. Diese steigt im höheren Lebensalter zwischen 75-84 Jahren auf 13 % an. Eine vergleichbare Prävalenz der CHI findet sich in England und im südwestlichen Europa (23;91) (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Prävalenz der Herzinsuffizienz (in %) verschiedener Länder.

Alter (Jahre)	Rotterdam-Studie (Niederlande)			Allgemein Praxis (England)	NHANES (USA)			Epica-Studie (Portugal)
	Männer	Frauen	Gesamt		Männer	Frauen	Gesamt	
55-64	0,7	0,6	0,7		4,5	3,0	3,7	2,9
65-74	3,7	1,6	2,7	2,7	4,9	4,3	4,5	7,6
75-84	14,4	12,1	13,0	7,4				14,50

Die European Society of Cardiology (ESC) gibt eine Prävalenz der symptomatischen Herzinsuffizienz von ~2% in der Gesamtbevölkerung an, womit 14 Millionen Europäer betroffen sind (30;32;103). Allein in den USA liegt die Inzidenz bei 500.000 Neuerkrankten pro Jahr und die Prävalenz bei 5 Millionen betroffenen Personen (99). Dabei ergab sich in den letzten 15 Jahren ein Zuwachs der Prävalenz um 3 Millionen CHI-Patienten (1;99).

Die CHI macht in den europäischen Ländern jährlich 1-2% der Gesundheitskosten aus (83). Dabei verursacht sie in den USA allein 6,5 Millionen Krankenhaustage (37) und ist somit die häufigste Ursache für Krankenhausaufenthalte. Die anfallenden Kosten betragen allein in den USA über \$15 Milliarden pro Jahr (74). Trotz umfangreicher Forschungsaktivitäten verbunden mit erheblichen Fortschritten in Diagnostik und Therapie ist die Prognose der Erkrankung nach wie vor schlecht (54). Bei stationären CHI Patienten beträgt die 1-Jahres-Mortalitätsrate ca. 20-30% (7;37;41;54;77). In der UK-Heart-Studie (United Kingdom Heart Failure Evaluation and Assessment of Risk Trial) wurde bei Patienten mit im Vordergrund stehender systolischer HI eine 5-Jahres-Mortalitätsrate von 41,5% und bei Patienten mit diastolischer HI eine 5-Jahres-Mortalitätsrate von 25,5% gefunden (76). Eine dänische Langzeitstudie mit stationäre Patienten mit systolischer Dysfunktion ergab eine 1-Jahres-Mortalitätsrate von ca. 24% (41).

Aufgrund der hohen sozioökonomischen Relevanz der CHI kommt der Prävention durch die Erkennung und Modifikation von Risikofaktoren eine besondere Bedeutung zu. Große epidemiologische Studien fanden Hypertonie, ischämische Herzerkrankungen, Rauchen, Diabetes mellitus, Übergewicht und hohes Alter als die wichtigsten Risikofaktoren der CHI (63;137). Diese Risikofaktoren machen jedoch nur einen Teil des Gesamtrisikos für die Erkrankung an einer CHI aus. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien publiziert, die Homocystein (HCY) als Risikofaktor der CHI vermuten lassen (125;126). Die potentielle Bedeutung der

Hyperhomocysteinämie (HHCY) als Risikofaktor der CHI liegt in der hohen Prävalenz in der älteren Bevölkerung und in den interessanten therapeutischen Optionen.

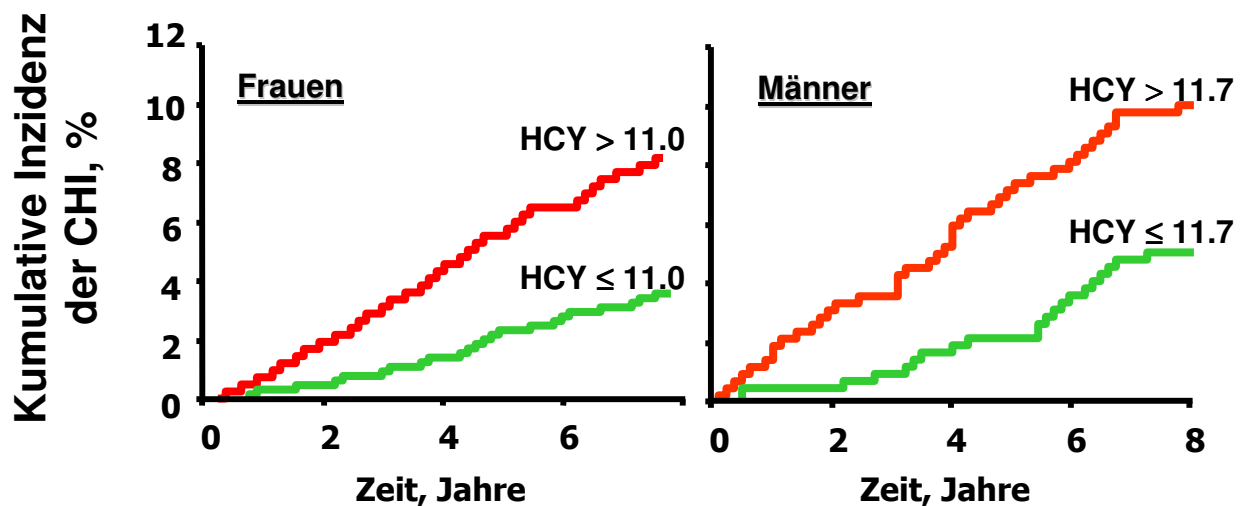
4 Klinische und experimentelle Datenlage der HHCY im Rahmen der CHI

Die HHCY wird seit kurzem als Risikofaktor der CHI diskutiert. Die klinische Bedeutung der HHCY lässt sich anhand der hohen Prävalenz von 5-10% in der Gesamtbevölkerung und von 40 % bei Patienten mit Gefäßerkrankungen erkennen (116). Derzeit gilt die HHCY als unabhängiger Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und trägt mit 10% wesentlich zum Gesamtrisiko bei (15;40). Klinische Daten lassen vermuten, dass jedes $\mu\text{mol/l}$ Homocysteinanstieg mit einer 6–7%igen Risikoerhöhung assoziiert ist (14). Dementsprechend könnten, basierend auf unterschiedlichen Berechnungsgrundlagen, durch Senkung erhöhter Homocysteinspiegel bis zu 25 % der kardiovaskulären Ereignisse vermieden werden (96;123;128). Eine HHCY gilt ebenfalls als unabhängiger Risikofaktor für thrombotische, neurodegenerative und Schwangerschafts-assoziierte Erkrankungen (116). Gerade mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz der HHCY zu (116). Der Altersgipfel der HHCY, welches sich mit dem Altersgipfel der CHI überschneidet, liegt im fortgeschrittenen Lebensalter (126). Da sowohl die Inzidenz als auch der Schweregrad der CHI mit der Höhe der HHCY korrelieren, kann ein Kausalzusammenhang zwischen HHCY und CHI vermutet werden (47;125).

Die erste klinische Studie, die eine Verbindung zwischen HCY und CHI herstellte, wurde an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz durchgeführt (13). In dieser Querschnittsstudie, die 75 Patienten einschloss, fand sich eine positive Korrelation zwischen HCY und dem kardialen Massen-Index, der Septumdicke, der Hinterwanddicke sowie dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wocial et al., die 37 Patienten mit essentieller Hypertonie untersuchten. Auch hier fand sich eine positive Korrelation zwischen HCY und dem kardialen Massen-Index (132). Cooke et al. beobachtete

höhere HCY-Werte bei 37 CHI-Patienten und 93 Post-Herztransplantations-Patienten im Vergleich zu 18 gesunden Kontrollen (28).

In einer großen Untersuchung an 600 randomisiert selektierten Krankenhaus-Patienten fanden Ventura et al. eine altersbezogene Korrelation zwischen dem Vorliegen einer CHI und einer HHCY (126). Daten aus der prospektiven Framingham-Studie belegen darüber hinaus eine deutlich erhöhte Inzidenz der CHI bei Personen mit HCY-Werten oberhalb der geschlechtsspezifischen Medians (125). Dieser Zusammenhang zeigte sich bei Männern und Frauen gleichermaßen (s. Abbildung 1).



Geschlechts-spezifische Mediane der HCY-Konzentration, µmol/L Vasan RS et al., JAMA 2003

Abbildung 1: Kumulative Inzidenz der CHI in Personen mit HCY ober- bzw. unterhalb des geschlechtsspezifischen Medians. Die Daten stammen aus der prospektiven Framingham-Studie mit 1547 Frauen und 944 Männer, Alter zwischen 60-95 Jahren, ohne vorausgehenden Myokardinfarkt (Beobachtungsdauer 8 Jahre).

Neben dem Zusammenhang zwischen HHCY und Inzidenz der CHI konnten Herrmann et al. auch eine signifikante Korrelation des HCY-Spiegels mit dem Schweregrad der CHI zeigen. Dabei wurden Beziehungen mit klinischen (NYHA), echokardiographischen (LVEDD, EF) und laborchemischen (NT-proBNP) Parametern gefunden (47) (s. Abbildung 2).

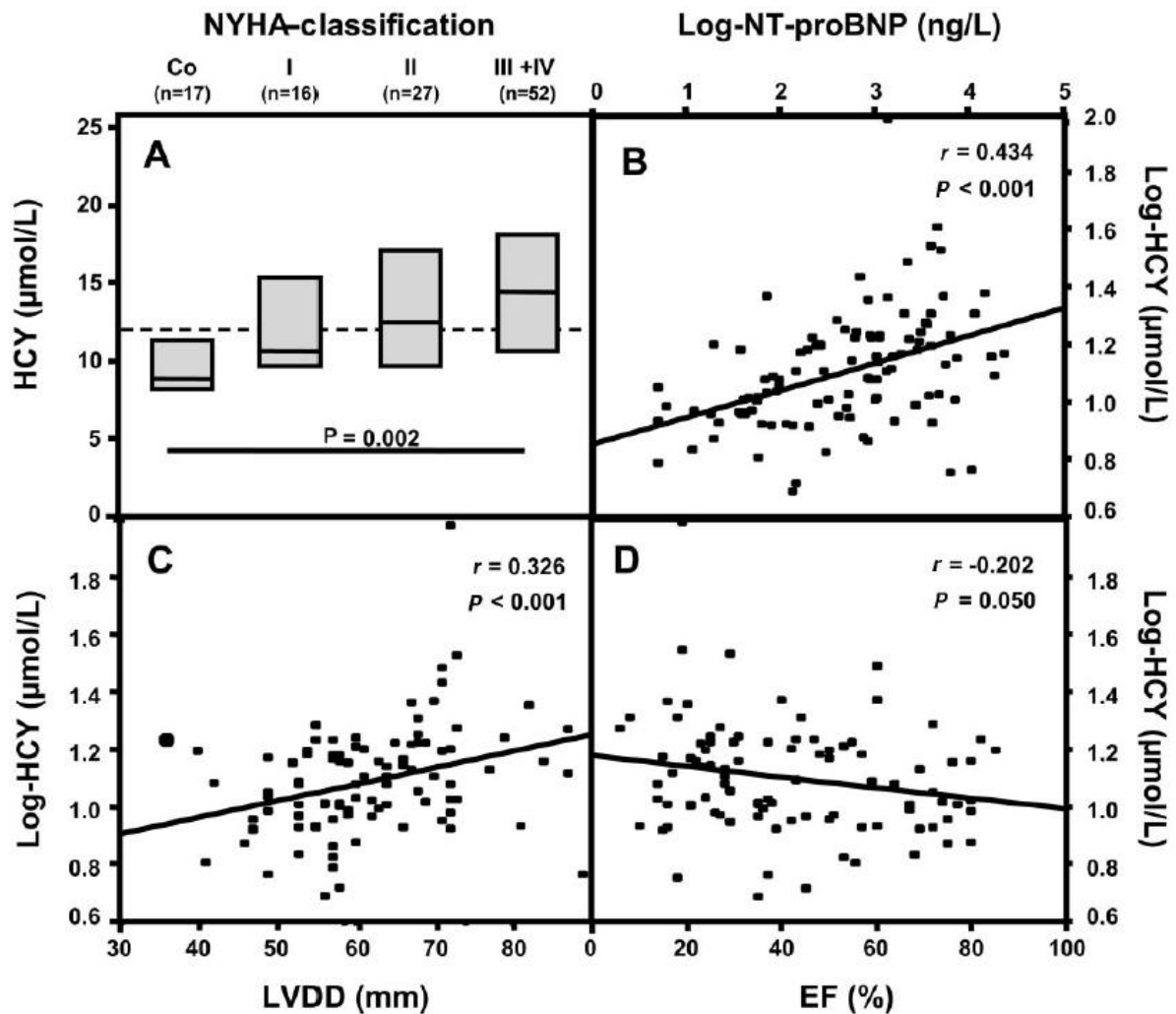


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen HCY Konzentration und anderen Parametern der CHF. (A), Boxplot (25th–75th Perzentile) Beziehung zwischen HCY und NYHA Klassifikation. Co, Kontrollen. (B), Pearson Korrelations-Analyse von $\log(\text{HCV})$ und $\log(\text{NT-proBNP})$. (C), Pearson Korrelations-Analyse von $\log(\text{HCV})$ und LVDD. (D), Pearson Korrelations-Analyse von $\log(\text{HCV})$ und Ejektions Fraktion (EF).

Zwei weitere Studien belegen dies durch HCY-Plasmaspiegel-abhängige linksventrikuläre Struktur- und Funktionsveränderung (25;119): Cesari et al. zeigten bei hypertensiven Patienten eine negative Korrelation zwischen HCY und EF. HCY war in dieser Studie der stärkste Prädiktor für eine reduzierte EF (25). Sundstrom et al. wiesen in einem Subkollektiv der Framinghamstudie eine positive Korrelation zwischen HHCV und dem linksventrikulären Massen-Index (LVMI) sowie der kardialen Wanddicke (119) nach. Da die HHCV ein Risikofaktor der KHK ist, die KHK aber auch regelmäßig an der Entstehung einer CHI beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob der Zusammenhang zwischen CHI und HHCV nur durch die kardiovaskulären Effekte des HCV bedingt sind oder ob direkt toxische Effekte auf das Myokard

existieren. Zusammenfassend belegen die klinischen Studien Zusammenhänge zwischen der HHCY und der Inzidenz sowie dem Schweregrad der CHI. Dies deutet darauf hin, dass die HHCY möglicherweise als Risikofaktor der CHI anzusehen ist.

Um die HHCY als kausal wirksamen Risikofaktor zu etablieren, muss die Ursachen-Wirkungsbeziehung zwischen HHCY und dem Auftreten der CHI nachgewiesen werden. Hierzu sind experimentelle Studien nötig, von denen es bislang aber nur wenige gibt.

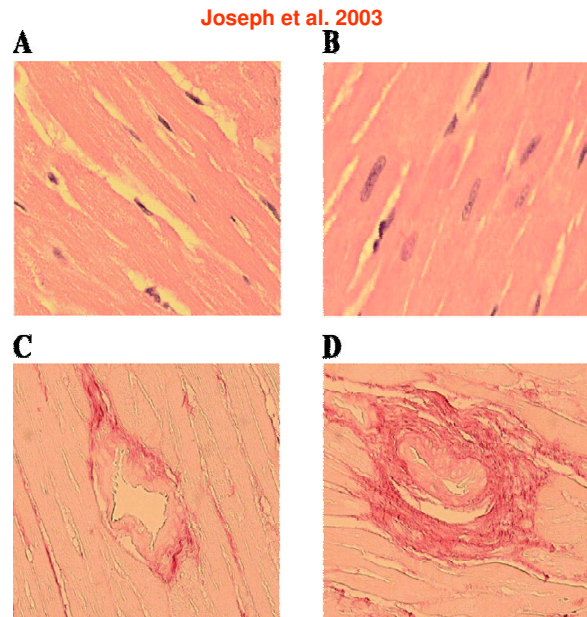
Die meisten dieser Versuche wurden von der Arbeitsgruppe um Joseph et al. durchgeführt. In einer ersten Studie wurden spontan hypertensive Ratten (SHR) mit einer Homocystin angereicherten Diät (Homo) und einer Homocystin angereicherten Vitaminmangel-Diät (Vitaminmangel-Homo) gefüttert. Unter der Homo-Diät entwickelte sich eine intermediäre HHCY (IH) und unter der Vitaminmangel-Homo-Diät eine schwere HHCY (SH) (58). Die mittleren HCY-Plasmaspiegelkonzentrationen betrugen für die Kontrollgruppe 4,3 µmol/L, 47,1 µmol/L für die IH-Gruppe und 202,8 µmol /L für die SH-Gruppe. Nach 10 Wochen Fütterung zeigte sich eine Zunahme des interstitiellen und perivaskulären Kollagens, sowie eine Zunahme der Mastzellen im Myokard. Aus diesen strukturellen Veränderungen schlossen die Autoren auf ein gestörtes kardiales Remodelling. Die histologischen Veränderungen wurden von einem erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) als Indikator einer diastolischen Dysfunktion begleitet. Zusätzlich hatten sich eine Mediaverdickung und ein Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes entwickelt. Blutdruck, systolischer Spitzendruck, Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit blieben unbeeinträchtigt. Auch das relative Herzgewicht und kardialer Myozytendurchmesser wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

In einer anschließenden Studie wurden statt SHR, normotensive Ratten verwendet (55). Dieser Versuch bestätigte die vorherigen Ergebnisse. Zusätzlich waren ein erhöhtes relatives Herzgewicht und ein vergrößerter Myozytendurchmesser nachweisbar (s. Abbildung 3).

Abbildung 3:

Repräsentative histologische Fotografien des linken Ventrikel:

Hämatoxylin-Färbung des Myokards von Kontrollen (A) und IH-Tieren (B). Bei den IH-Tieren ist eine deutliche Hypertrophie der Kardiomyozyten zu beobachten. Die Vermehrung des perivaskulären Kollagens in der IH-Gruppe (D) im Vergleich zu den Kontrollen (C) ist in den unteren Abbildungen mittels Picrosirius-Färbung dargestellt. Vergrößerungen: A und B x 200; C und D x 100;



Die Echokardiographie ergab eine vergrößerte Septumdicke und Hinterwanddicke, eine erniedrigte linksventrikuläre diastolische Lumenfläche und folglich eine konzentrische Hypertrophie.

Ergänzt wurden diese Beobachtungen durch Untersuchungen am linken Vorhof, der aus der IH-Gruppe und SH-Gruppe entnommen und in einem Elektrolytbad elektrisch stimuliert wurden (57). Die Inotropie des linken Vorhofs erwies sich als signifikant erhöht. Hohe Isoproterenol-Konzentrationen führten beim HCY-behandelten Vorhof zu einem stärkeren Anstieg der Kontraktionskraft verglichen mit den Kontrollen, was auf eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der adrenergen Rezeptoren am Myokard zurückgeführt werden kann. Zusätzlich wies eine Zunahme des interstitiellen Kollagens im linken Vorhof auf ein Fibrose hin. Die Autoren vermuteten darin eine Anpassung des linken Vorhofs an die Veränderungen des linken Ventrikels. Dabei beziehen sie sich auf eine Studie von Braunwald et al. (16) die zeigte, dass der mittlere linke Vorhofdruck bei ventrikulärer Dysfunktion erhöht ist.

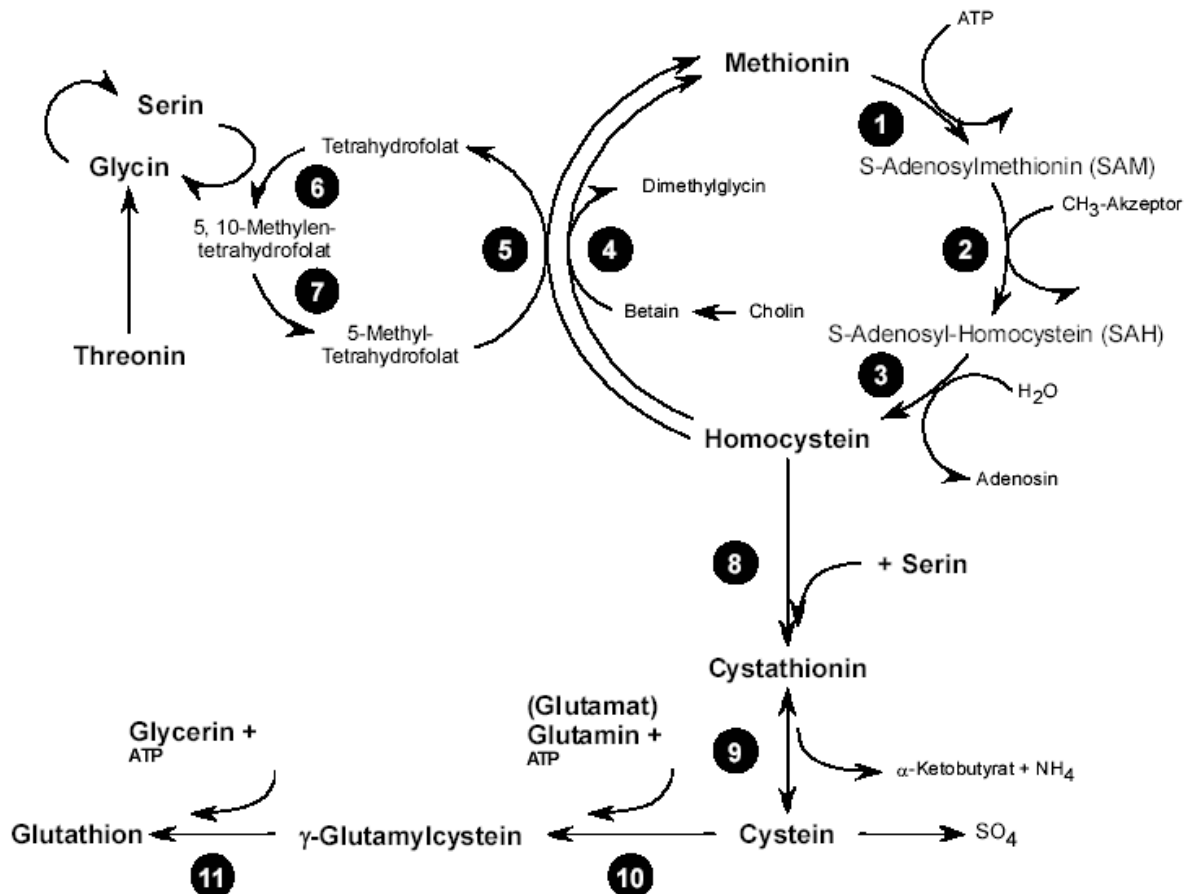
In einer weiteren Studie in ex-vivo-perfundierten Rattenherzen konnte ein endothelial bedingter negativer inotroper Effekt von HCY festgestellt werden, der weder durch Stickstoffmonoxid (NO), Atropin, noch durch Cyclooxygenase-Produkte erklärt werden konnte (65). Da unter dem Einfluss von HCY die endotheliale Adenosin-Produktion erhöht wurde, versuchte man durch gleichzeitige Blockade der

Adenosin-Rezeptoren eine Wiedererhöhung der Inotropie zu erreichen (64). Zwar verbesserte sich die Kontraktionskraft des Herzens, allerdings war der Effekt schwach, so dass weitere Faktoren vermutet werden, die für die negative Inotropie ursächlich sind.

Zusammenfassend wiesen alle diese Versuche darauf hin, dass eine HHCY eine Hypertrophie sowie und ein pathologisches Remodeling hervorruft. Ebenfalls deutet der erhöhte diastolische Druck auf eine diastolische Dysfunktion hin.

5 HCY-Stoffwechsel

HCY ist eine nicht-proteinbildende schwefelhaltige Aminosäure, die als Intermediärprodukt im Methionin-Stoffwechsel entsteht (s. Abbildung 4).



- | | |
|--|--|
| 1. S-Adensyl-L-Methionin Synthetase = Methionin-Adenosyltransferase | 7. Methylen-Tetrahydrofolat Reduktase |
| 2. Transmethylierungsreaktionen | 8. Cystathionin β-Synthase, B ₆ anhängig |
| 3. S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase | 9. γ-Cystathionase = Cystathionin-γ-Lyase, B ₆ abhängig |
| 4. Betain-Homocystein Methyltransferase | 10. Glutamyl-Cystein-Synthetase |
| 5. Homocystein-Methyltransferase = Methionin- Synthase, B ₁₂ abhängig | 11. Glutathion-Synthetase |
| 6. Serin-Transhydroxymethylase, B ₆ abhängig | |

Abbildung 4: Das Methionin-Homocystein-Glutathion-System (modifiziert nach Löffler und Petrides, 2003; Resch et al., 1995)

Die schwefelhaltige Aminosäure Methionin fungiert in ihrer aktivierten Form dem S-Adenosyl-Methionin (SAM) als universeller Methylgruppendonor im menschlichen Organismus. Dabei werden die Methylgruppen auf ein breites Spektrum von

Akzeptoren übertragen, wie z.B. Myelin, Melatonin, DNA, RNA und Kreatinin. Durch die Übertragung der Methylgruppe entsteht aus SAM S-Adenosyl-Homocystein (SAH), welches mithilfe der S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase zu HCY und Adenosin hydrolysiert wird. Dieses HCY stellt eine zelltoxische Aminosäure dar. Daher ist die Zelle bestrebt dieses Intermediärprodukt zu eliminieren bzw. in weniger gefährliche Substanzen umzuwandeln. Hierfür stehen der Zelle drei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen wird HCY durch Aufnahme einer Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) oder von Betain zu Methionin remethyliert (Remethylierung). Alternativ kann HCY mit Hilfe von Cystathionin- β -Synthase (CBS) und γ -Cystathionase katabolisiert werden. Dabei kondensiert HCY mit Serin zu Cystathionin, das irreversibel zu Cystein und α -Ketobutyrat hydrolytisch gespalten wird (Transsulfurierung). Mit Ausnahme der Remethylierung über Betain, stellen die Remethylierung über 5-Methyl-THF als auch die Transsulfurierung vitaminabhängige Reaktionsschritte dar. Über die Remethylierung und Transsulfurierung hinaus gibt es die Möglichkeit des aktiven Exports des HCY aus der Zelle ins Plasma. Im Plasma liegt HCY in weniger als 2% in der freien, reduzierten Form vor. Der überwiegende Teil ist auf verschiedene Art und Weise an Proteine gebunden (s. Abbildung 5).

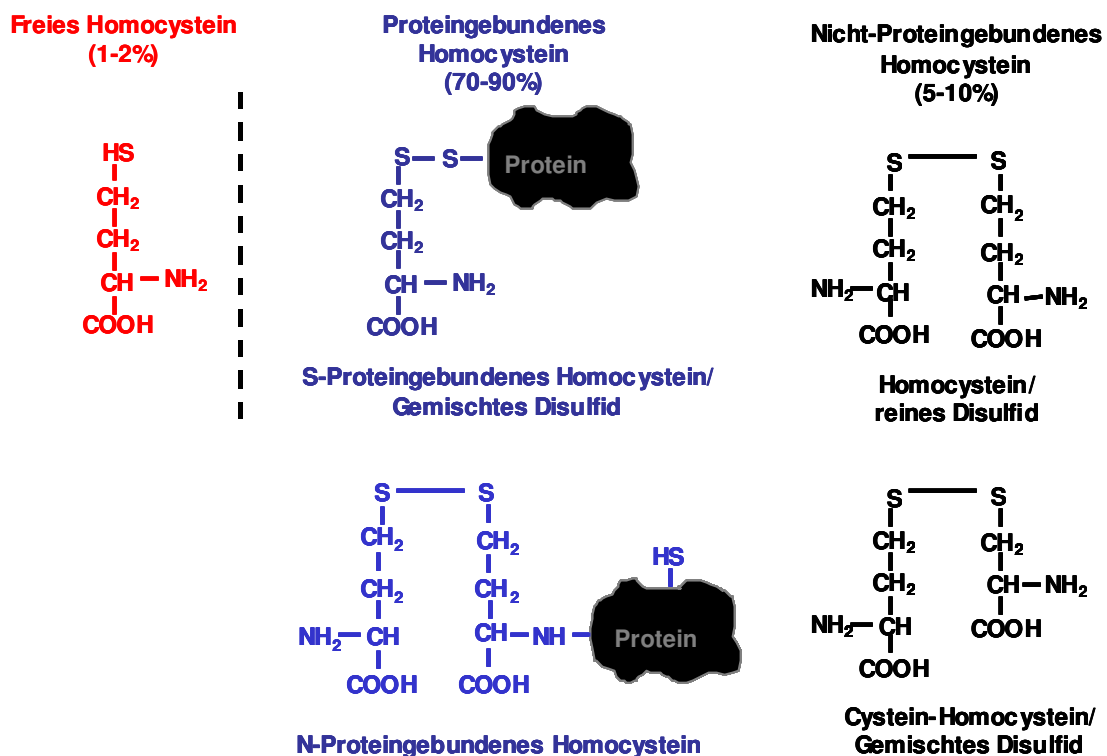


Abbildung 5: Im Plasma vorliegende Homocystein-Formen.

Den zytotoxischen Effekt bewirkt HCY hauptsächlich über oxidativen Stress, der durch Autooxidation, H₂O₂-Bildung (52), Inhibition der Glutathion-Peroxidase (90) und Senkung der antioxidativen Kapazität im Plasma (127) verursacht wird.

Es wird angenommen, dass die Zunahme von oxidativen Stress im Herz eine wesentliche Komponente in der Pathogenese der Herzinsuffizienz darstellt. Neben tierexperimentellen Studien (8;111) zeigen auch mehrere klinische Arbeiten eine Assoziation der CHI mit vermehrtem oxidativen Stress (5;35;62;80;112;115;136). Die Induktion von oxidativem Stress durch die Verminderung der NO-Verfügbarkeit und einer gesteigerten Sauerstoffradikalbildung ist vermutlich der primär pathologische Prozess im Rahmen der HH CY-induzierten CHI. Tyagi et al. (121) zeigten in einer Zellkulturstudie eine HCY-abhängige Verminderung des Stickstoffmonoxid (NO). Da verschiedene Studien bereits eine Überproduktion von Superoxid und Peroxynitrit, zwei potenten Oxidantien, bei Abnahme des NO nachgewiesen haben (19;110;121), ist bei HH CY von einer gesteigerten oxidativen Belastung auszugehen. In einer Nachfolgestudie konnten Tyagi et al. nachweisen, dass NO auch an der Regulation des kardialen Remodelings beteiligt ist und ein wichtiges antihypertrophes Agens darstellt (122).

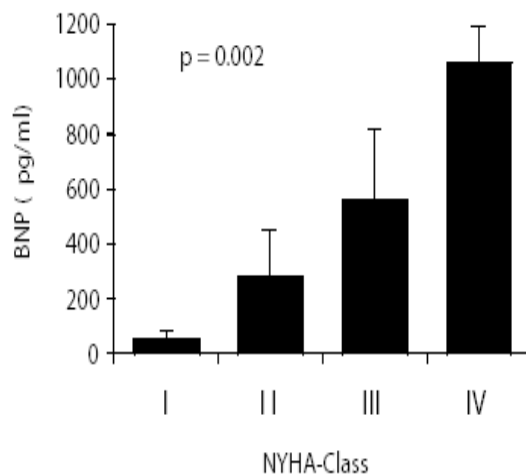
6 Brain Natriuretic Peptide (BNP)

BNP ist ein Protein, das in vivo natriuretisch und diuretische Wirkung erzielt. Der überwiegende Anteil wird im Myokard des linken Ventrikels synthetisiert. BNP wurde erstmals in Schweinehirn nachgewiesen. Mittlerweile wurde gezeigt, dass der überwiegende Teil im Ventrikel synthetisiert und ins Blut sezerniert wird. Im klinischen Alltag sind sowohl das aktive Hormon BNP als auch das inaktive Spaltprodukt N-terminal fragment of the pro-peptide of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) eingesetzt, dabei werden derzeit beide als gleichwertig angesehen, wobei es jedoch deutliche Unterschiede in der Halbwertszeit (HWZ) gibt (BNP-HWZ: 22min, NT-proBNP-HWZ: 120min (81;92)). Trotz Unterschiede sind beide Marker geeignet einen Eindruck über die aktuelle Funktion des Herzens wiederzugeben und werden daher im weiteren vereinfacht als BNP zusammengefasst (12). Da der Großteil der zirkulierenden BNP-Menge im Ventrikel produziert wird, wird BNP als

Marker für die ventrikuläre Dysfunktionen angesehen (95;120). Die Plasma-Konzentration ist dabei direkt proportional zur Höhe der Druckbelastung (78;120) und ist ein unabhängiger Prädiktor einer erhöhten LVEDP (81;92). Erhöhte BNP-Spiegel finden sich darüber hinaus auch bei einer diastolischen Dysfunktionen. Verschiedene Studien (47;78;120) konnten außerdem zeigen, dass der BNP-Plasmaspiegel auch den Schweregrad der CHI widerspiegelt und daher mit der NYHA-Klassifikation korreliert (s. Abbildung 6). Des Weiteren finden sich erhöhte BNP-Werte bei ventrikulärer Hypertrophie, Herzklappenerkrankungen, akuter und chronischer Ischämie sowie arterieller Hypertonie und der Lungenembolie. Häufig sind erhöhte NT-proBNP-Werte bereits vor dem Nachweis echokardiographischen Veränderungen messbar und können sowohl systolische als auch diastolische Dysfunktionen anzeigen, was ihn für experimentelle Fragestellungen wichtig macht (12;29).

Abbildung 6:

Mit ansteigender NYHA-Klassifikation stieg ebenfalls der BNP-Level (Mittelwert \pm SD): von 51 ± 20 pg/ml bei Patienten mit NYHA I auf 281 ± 223 pg/ml bei Patienten mit NYHA II, 562 ± 346 pg/ml bei Patienten mit NYHA III, und 1061 ± 126 pg/ml bei Patienten mit NYHA IV ($p = 0.002$).



7 Ziel der Arbeit

Bisher wurde der kausale Zusammenhang zwischen HHcy und CHI nur mittels Echokardiographie, Histomorphometrie und ex-vivo Perfusion belegt (55;57;65). Alle diese Verfahren weisen zum Teil eine erhebliche Abhängigkeit vom Untersucher auf und gehen mit einer eingeschränkten Reproduzierbarkeit einher. BNP ist ein moderner biochemischer Marker der CHI, der sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und eine gute Standardisierung des analytischen Prozesses auszeichnet (50). Darüber hinaus verfügt BNP über einen hohen negativen prädiktiven Wert (50;82;97). Aufgrund der existierenden Daten und der analytischen Vorteile von BNP kann spekuliert werden, dass eine isolierte HHcy in vivo zu einer signifikanten Induktion von BNP führt. Ziel der Arbeit war es deshalb, diese Hypothese in einem Tierversuch zu untersuchen. Dazu sollte bei gesunden erwachsenen Wistar-Ratten auf zwei verschiedenen Wegen eine isolierte HHcy induziert werden und die Auswirkungen auf die BNP-Expression sowie das myokardiale Remodelling analysiert werden. Um den Kausalzusammenhang zu erhärten, sollte darüber hinaus natives ex-vivo Myokardgewebe mit ansteigenden HHcy-Konzentrationen superfundiert werden und die Auswirkungen auf die BNP-Expression erfasst werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen dazu beitragen, die HHcy als Risikofaktor und kausal wirksames Agens in der Pathogenese der CHI zu etablieren.

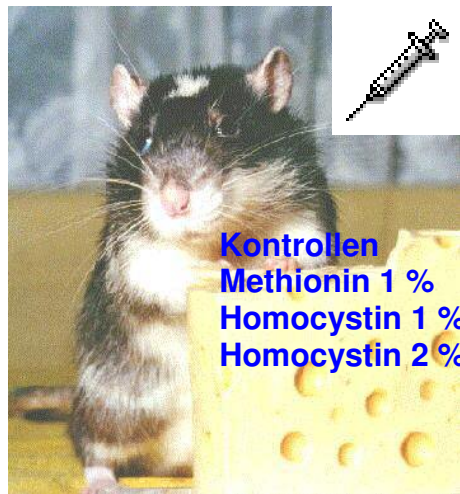
III Material und Methodik

1 Studiendesign

In einem Fütterungsversuch wurden insgesamt 50 Ratten auf 5 Gruppen à 10 Tiere aufgeteilt und über 3 Monate mit 4 verschiedenen Diäten gefüttert. Ziel der Diäten war es, einen Anstieg des Homocystein(HCY)-Plasmaspiegels auf verschiedenen biochemischen Wegen zu induzieren. Am Ende des Versuchs wurden das Blutplasma und das Myokard mittels biochemischer, histomorphometrischer und molekularbiologischer Methoden hinsichtlich Herzinsuffizienz-typischer Veränderungen untersucht. Aufgrund von Platzmangel im Tierstall konnten nicht alle Gruppen parallel bearbeitet werden. Deshalb wurden die Ratten auf 2 Durchgänge aufgeteilt. Der erste Durchlauf beinhaltete die folgenden 3 Gruppen: Methionin (Met), Homocystin 1% (Homo 1%) und eine Kontrollgruppe (Ko1). Im zweiten Versuchsdurchlauf wurden die Homocystin 2% (Homo 2%)- und eine weitere Kontrollgruppe (Ko2) untersucht.

Kapillare Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der Fütterung aus dem retrobulbären Plexus des Auges und am Versuchsende aus dem rechten Ventrikel. Hierzu wurden die Tiere anästhetisiert und anschließend Heparin-Vollblut entnommen. Herzfrequenz, Blutdruck und Körperendgewicht wurden kurz vor Versuchsende bestimmt. Nach der zweiten Blutentnahme wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkotika euthanasiert und das Herz sowie die Lungen für weitere Untersuchungen entnommen. Die asservierten Organe wurden zunächst gewogen. Anschließend wurde aus dem Herzen der linke Ventrikel isoliert und in vier Aliquote geteilt. Ein Aliquot wurde für histomorphometrische Analysen fixiert und die anderen drei in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Als Kenngrößen der Herzinsuffizienz wurden histomorphometrisch die Mastzellichte, das perivaskuläre und interstitielle Kollagen und der BNP-Gehalt im Gewebe bestimmt. Zusätzlich wurden aus dem Blutplasma BNP, HCY, Folsäure und Vitamin B₁₂ bestimmt. (s. Schaubild 1).

3 Monate alte Wistar-Ratten



1. Blutentnahme

6 Monate alte Wistar-Ratten



2. Blutentnahme und Organentnahme (Herz, Lunge)

Schaubild 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass erhöhtes HCY zu einer Induktion der BNP-Synthese und Sekretion führt, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Rainer H. Straub (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin des Klinikums der Universität Regensburg) frisch asserviertes ex-vivo-Rattenmyokardgewebe mit konditioniertem HCY-Medium superfundiert.

2 Tiermodell

Es wurden 10 Wochen alte weibliche Wistar-Ratten von Charles River (Sulzfeld, Deutschland), mit annähernd gleichem Ausgangskörpergewicht von 240g, verwendet. Im Sinne einer Akklimation wurden die Tiere nach Eintreffen aus der Zuchthaltung für einige Tage mit Standard-Diät und Leitungswasser versorgt. Erst dann erfolgte die Randomisierung der Tiere in die oben bezeichneten Gruppen.

Für die Randomisierung wurden jeweils 25 Tiere zusammen in einen großen Behälter gebracht. Aus der Mitte dieses Behälters wurde jeweils eine Ratte

entnommen und einer der Gruppen zugeteilt. In einem ersten Durchlauf wurden die Ratten in die Gruppen 1 bis 5 einsortiert, in einer 2. Runde in umgekehrter Reihenfolge usw. bis der Behälter leer war. Die restlichen 25 Tieren wurden nach dem selben Schema randomisiert. Dieses Verfahren diente der Gruppengleichheit.

Jede Ratte wurde mit einer spezifischen Ohrlochkombination versehen, bestehend aus ganzen und halben Löchern. Zusätzlich wurde jeder Käfig durch eine Aufschrift der zugehörigen Diätgruppe gekennzeichnet. Somit war eine eindeutige Zuordnung gewährleistet.

Alle Tiere wurden in einem klimatisierten Raum untergebracht, in dem durch einen Zeitschalter 12:12h Tag- und Nacht-Zyklus simuliert wurde. Luftfeuchtigkeit und Temperatur betrugen konstant $52 \pm 10 \%$ bzw. $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Nahrung wurde in Form von Pellets dargereicht und stand den Tieren permanent und unlimitiert zur Verfügung. Die Fressmenge wurde durch regelmäßiges Wiegen der verbleibenden Nahrungsmenge am Wochenende ermittelt.

3 Diäten

Den Diäten aller Gruppen lag eine Standarddiät auf pflanzlicher Basis zu Grunde (Altromin C1000 Kontrolldiät und Altromin 1340 Haltungsdiät, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Deutschland, Lage), die in Form von Pellets dargereicht wurde. Die gereinigte Kontrolldiät C1000 enthielt alle wesentlichen Nahrungsbestandteile in definierter Menge:

- **Vitamin B1:** 20 mg/kg,
- **Vitamin B2:** 20 mg/kg,
- **Vitamin B6:** 15 mg/kg,
- **Vitamin B12:** 0,041 mg/kg,
- **Folsäure:** 10 mg/kg,
- **Energiegehalt:** 3518 Kcal/kg

Die native Haltungsdiät wies einen etwas höheren Vitamingehalt auf. Der Energiegehalt lag mit 2490 Kcal/kg etwas niedriger. Die unterschiedlichen Kontrolldiäten wurden gewählt, weil nach dem ersten Durchlauf festgestellt wurde, dass mit der Kontrolldiät die Vitaminkonzentrationen besser zu standardisieren waren. Im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe enthielten die Diäten der Met-, Homo 1%- und Homo 2%-Gruppen verschiedene Zusätze, um erhöhte HCY-Plasmaspiegel zu induzieren. Die detaillierten Zusammensetzungen für die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4

	Ko1	Met	Homo 1%	Ko2	Homo 2%
Basisdiät	Altromin 1340	Altromin 1340	Altromin 1340	Altromin C 1000	Altromin C 1000
L-Methionin* g/kg	4	24	4	4	4
DL-Homocystin**g/kg	0	0	10	0	20

* in der Standard-Diät sind bereits 4 g L-Methionin enthalten

** DL-Homocystin von Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

4 Narkoseverfahren

Für die Blut- und Organentnahme wurden die Ratten mit einer Ketamin-Rompun-Mischung (1:0,24) und einer Dosis von 0,1 ml pro 100 mg Körpergewicht narkotisiert. Dabei lag Rompun (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) in einer 2% und Ketamin (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) in einer 0,1% Lösung vor. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in Rücken- und leichter Kopfschräglage.

5 Analysen

5.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Bestimmung der allgemeinen Vitalparameter Herzfrequenz und systolischer Blutdruck erfolgte nicht-invasiv am Schwanz der wachen Ratte mit dem TSE Blutdruck-Monitor Serie 9000 (TSE Systems GmbH Bad Homburg, Germany), einer Blutdruckmanschette und einem piezoelektrischen Pulsaufnehmer. Für die Messungen wurden die Ratten vorübergehend in Blutdruckmesskäfigen fixiert. Da der Rattenschwanz bei Raumtemperatur nur schwach durchblutet ist, befanden sich die Käfige für die Messungen in einer TSE-Wärmebox (TSE Systems GmbH Bad Homburg, Germany), in der die Temperatur konstant 37°C betrug. Die Druckmanschette wurde den Tieren locker bis kurz vor die Schwanzwurzel geschoben und der Pulsaufnehmer hinter der Druckmanschette (ca. 1cm) festsitzend platziert. Die Manschette wurde nun schrittweise mit Hilfe eines Druckgenerators aufgeblasen und die Schwanzarterie dadurch schrittweise komprimiert (arterielle Okklusion). Beim vollständigen Verschließen der Arterie wurde der dazugehörige systolische Druck registriert. Anschließend erfolgte die Druckentlastung in der Manschette. Die Bestimmung der Herzfrequenz erfolgte dabei kontinuierlich aus dem Pulssignal über Mittelwertbildung.

5.2 Erhebung der Organparameter

5.2.1. Präanalytik: Aservierung der Organe

a) Rahmenbedingungen

Dem Operateur wurde durch eine zweite Person eine Ratte gereicht, deren Ohrlöcher in Abwesenheit des Operateurs mit Klebeband verdeckt wurden. Der Operateur war somit während der Messungen und Eingriffe verblindet. Vor dem

Eingriff wurden die Tiere wie in Kapitel 4 beschrieben narkotisiert. Dabei wurde für die finale Organentnahme die doppelte Dosis verabreicht (0,2 ml pro 100g KG).

b) Organentnahme

Vor dem Eingriff wurde die narkotisierte Ratte in Rückenlage auf einer stabilen Unterlage fixiert. Erstes Ziel war es, einen intrathorakalen Zugang zu schaffen, ohne die darin befindlichen Strukturen zu verletzen. Hierfür wurde von der zum Abdomen gerichteten Zwerchfellseite der „lungenfreie“ Recessus costodiaphragmaticus angeschnitten und damit eine Läsion der Lunge verhindert. Um allerdings einen freien Blick auf das Zwerchfell zu bekommen, wurden Fell und Bauchfell entlang der Medianlinie/Linea alba bis zum Thorax aufgeschnitten und kurz unterhalb des Zwerchfells parallel zum unteren Rippenbogen durchtrennt (s. Bild 1).

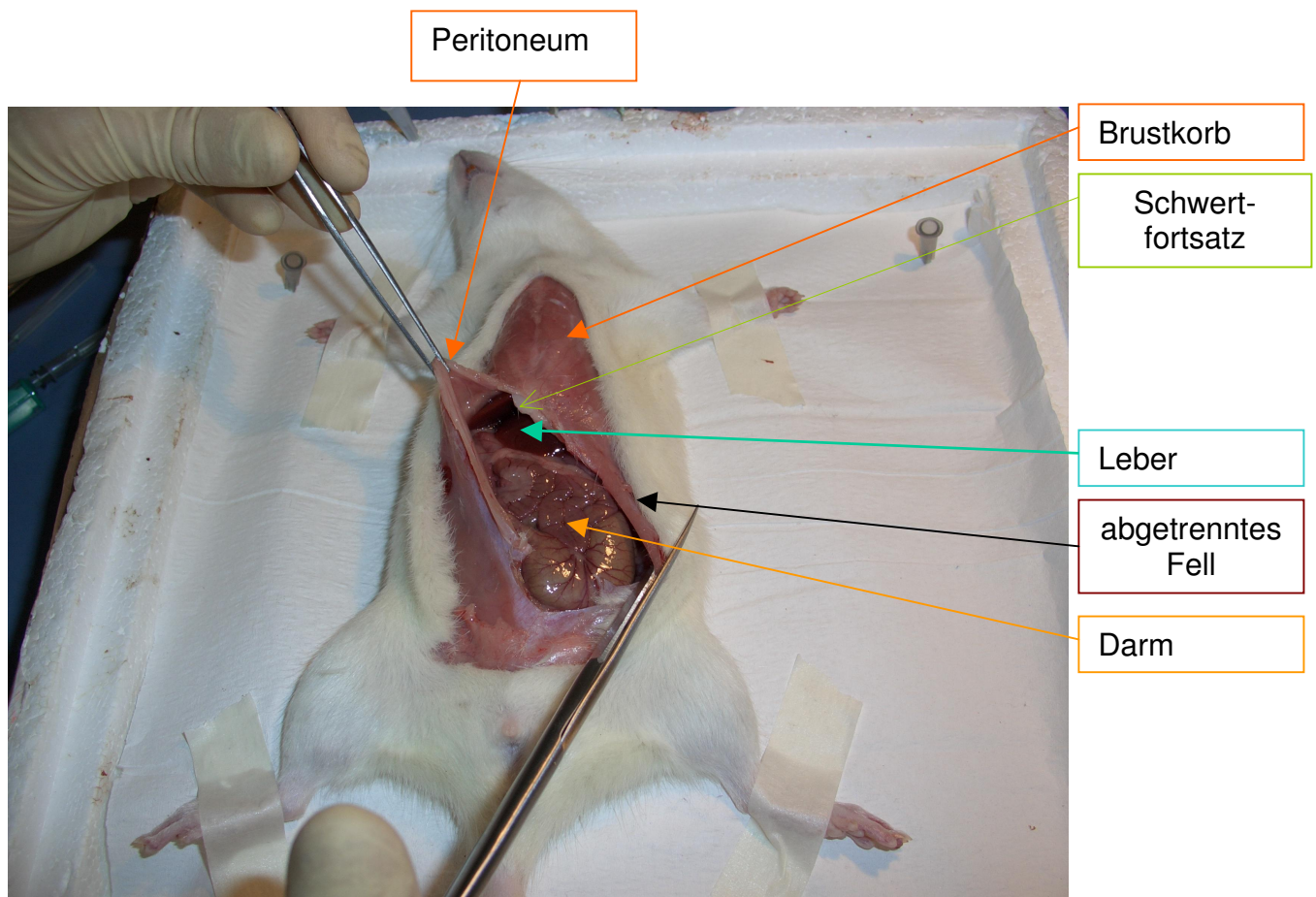


Bild 1: Fell und Peritoneum werden bis zum Schwertfortsatz längs eröffnet.

Als nächstes wurde der Thorax, nach Anschneiden des Zwerchfells und Kollabieren der Lunge, durch Durchtrennung der Rippen in der Paraaxillarlinie auf beiden Seiten bis zur 2. Rippe durchtrennt und nach oben geklappt (s. Bild 2).

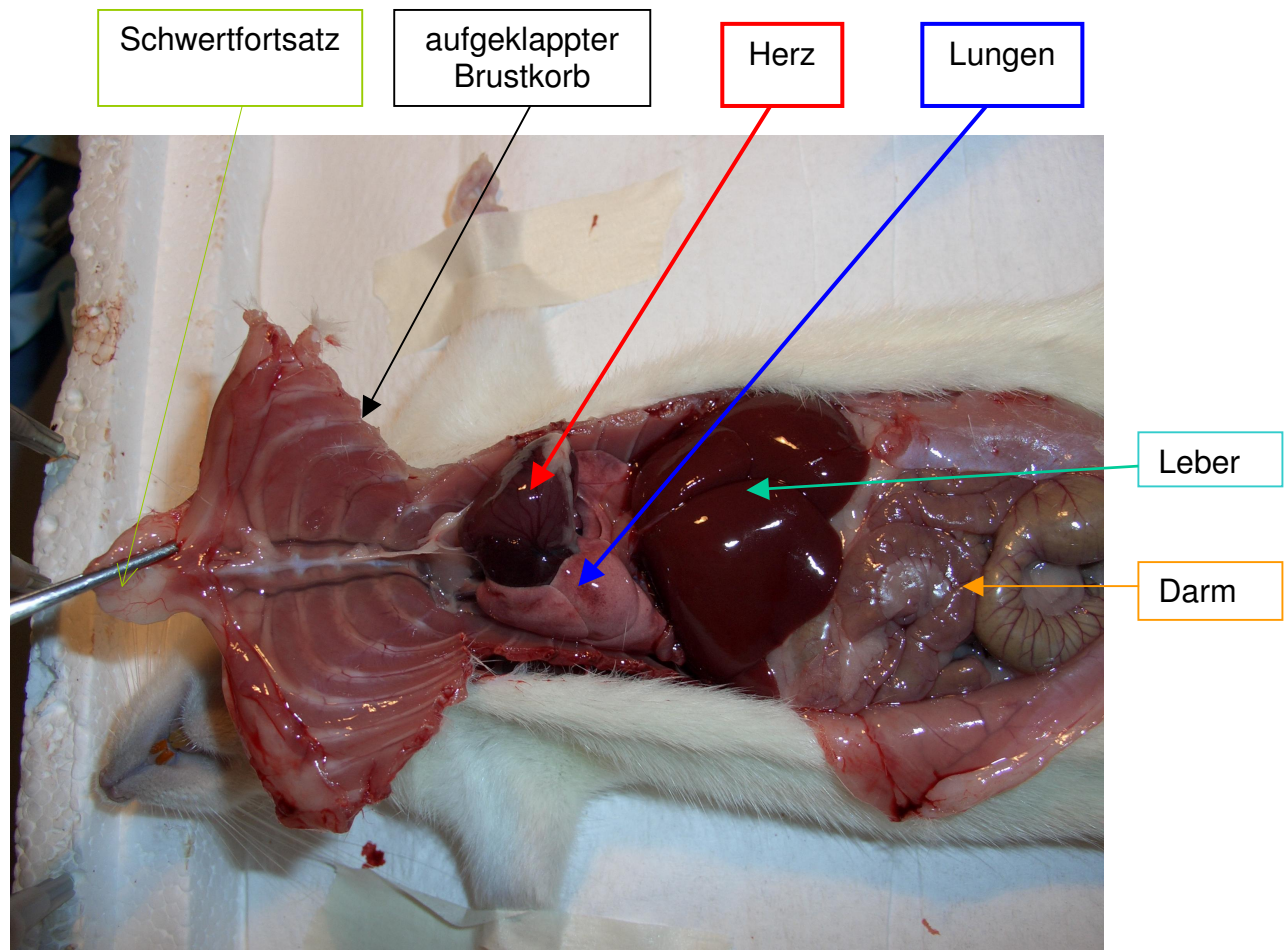


Bild 2: Darstellung der Thoraxorgane bei eröffnetem Thorax.

Das jetzt freiliegende Herz wurde am rechten Ventrikel mit einer frisch heparinisierten Spritze zur Blutentnahme punktiert (s. Bild 3). Das Blut wurde von einem Assistenten direkt zentrifugiert und das Plasma für die anschließende Lagerung in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt (siehe unten).

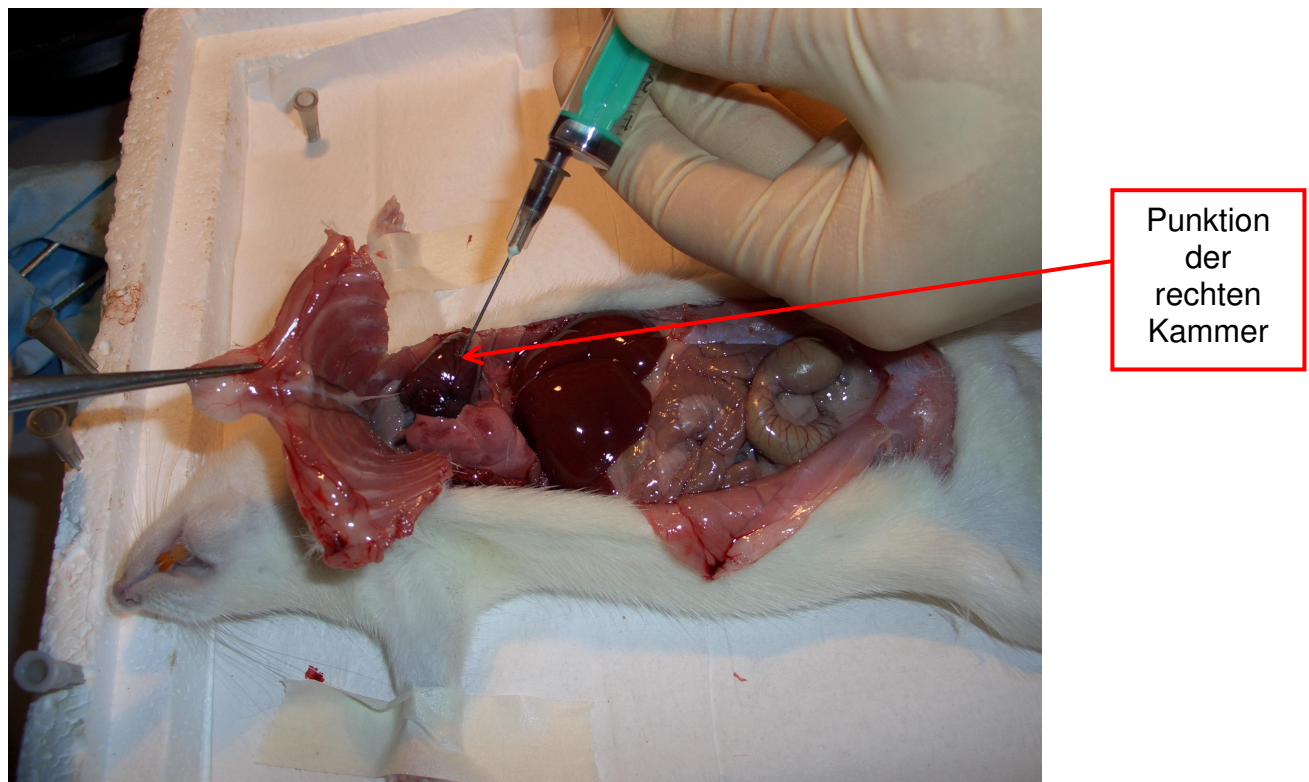


Bild 3: Punktion der rechten Herzkammer.

Dann erfolgte die Entnahme des Herzens. Dazu wurden erst die Vena cava inferior, die Aorta und die Vena cava superior en block durchtrennt und anschließend bei angehobenem Herzen die Venae pulmonalis durchschnitten. Dieses Verfahren wurde im Vorfeld so optimiert, dass die myokardiale Ischämiezeit möglichst kurz war. Nach der Entnahme wurde das Herz sofort in eisgekühlte isotone Krebs-Henseleit-Lösung (58) (NaCl : 118, CaCl_2 : 1,8, KCl : 3,7, MgCl_2 : 1,2, KH_2PO_4 : 1, NaHCO_3 : 27,1, Glc: 11,1 (mM)) gelegt und der linke Ventrikel mithilfe einer mikrochirurgischen Schere und Pinzette isoliert. Dafür wurden erst die Vorhöfe abgetragen und dann entlang der Septumgrenze die Wand des rechten Ventrikels entfernt (s. Bild 4).

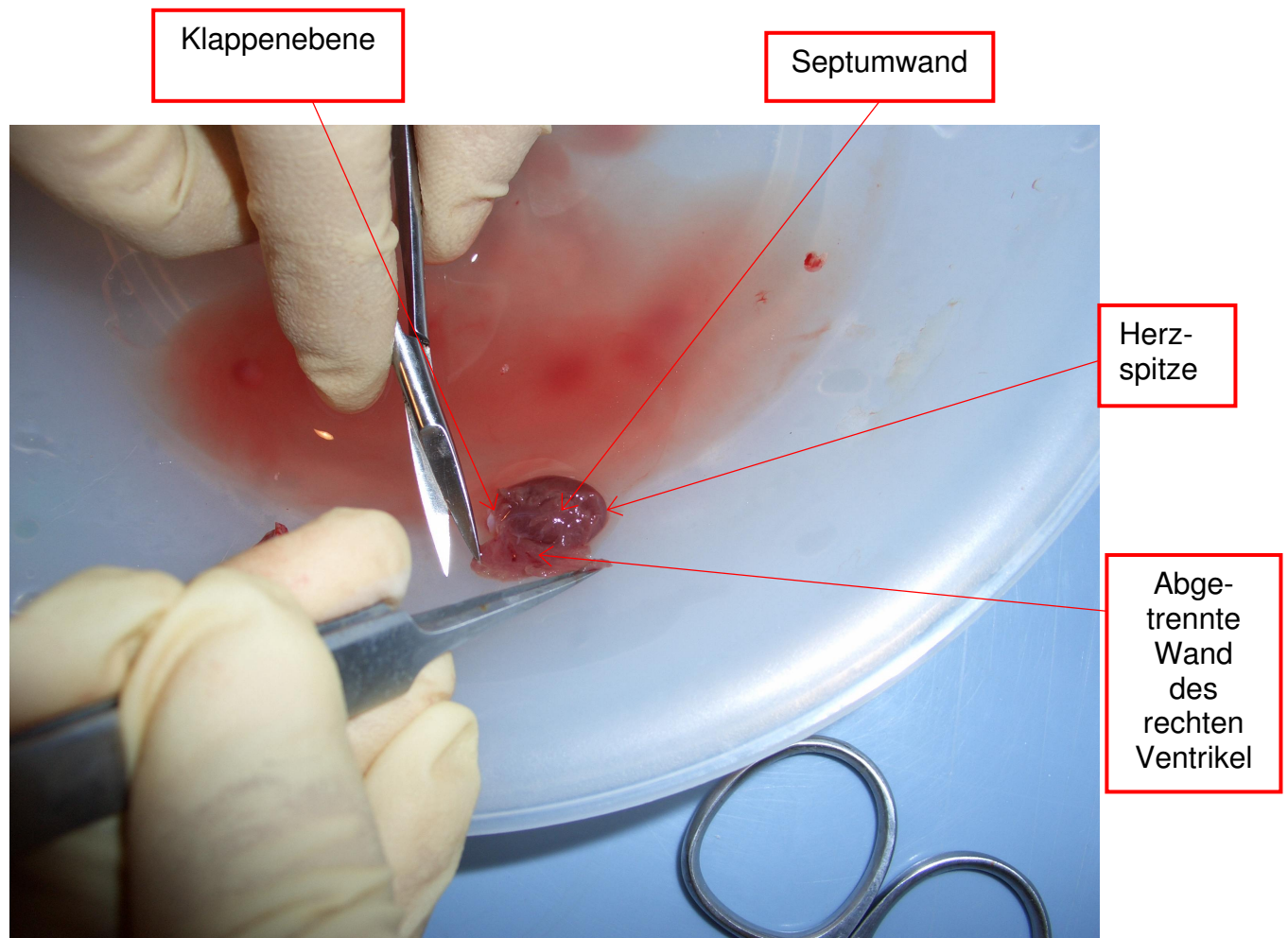


Bild 4: Präparation des Rattenmyokards. Vorhöfe sind bereits entfernt und die Wand des rechten Ventrikel wurde entlang der Septumgrenze ventral bis zur Herzspitze abgetragen. Der Einfluss- und Ausflusstrakt des rechten Ventrikel sind damit nicht mehr darstellbar.

Danach wurde der Ventrikel entlang der Herzachse in 4 Aliquote geteilt. Ein Aliquot wurde in 4% Formalin für die histologische Analytik gelagert, während die restlichen Aliquote zur molekularbiologischen Untersuchung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

5.2.2. Analytik

Wie in Kapitel 4.2.1. beschrieben erfolgte das Wiegen direkt im Anschluss an die Entnahme, Präparation und Aliquotierung des linken Ventrikels. Dieses Verfahren wies in Vorversuchen die geringsten Schwankungen auf ($< 0,5\%$). Zuletzt wurden die mit Blut benetzten Lungen kurz gespült und deren Gewicht bestimmt (s. Bild 5). Beide Organgewichte wurden mit einer Sartorius Genius Waage ermittelt (s. Bild 6) (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

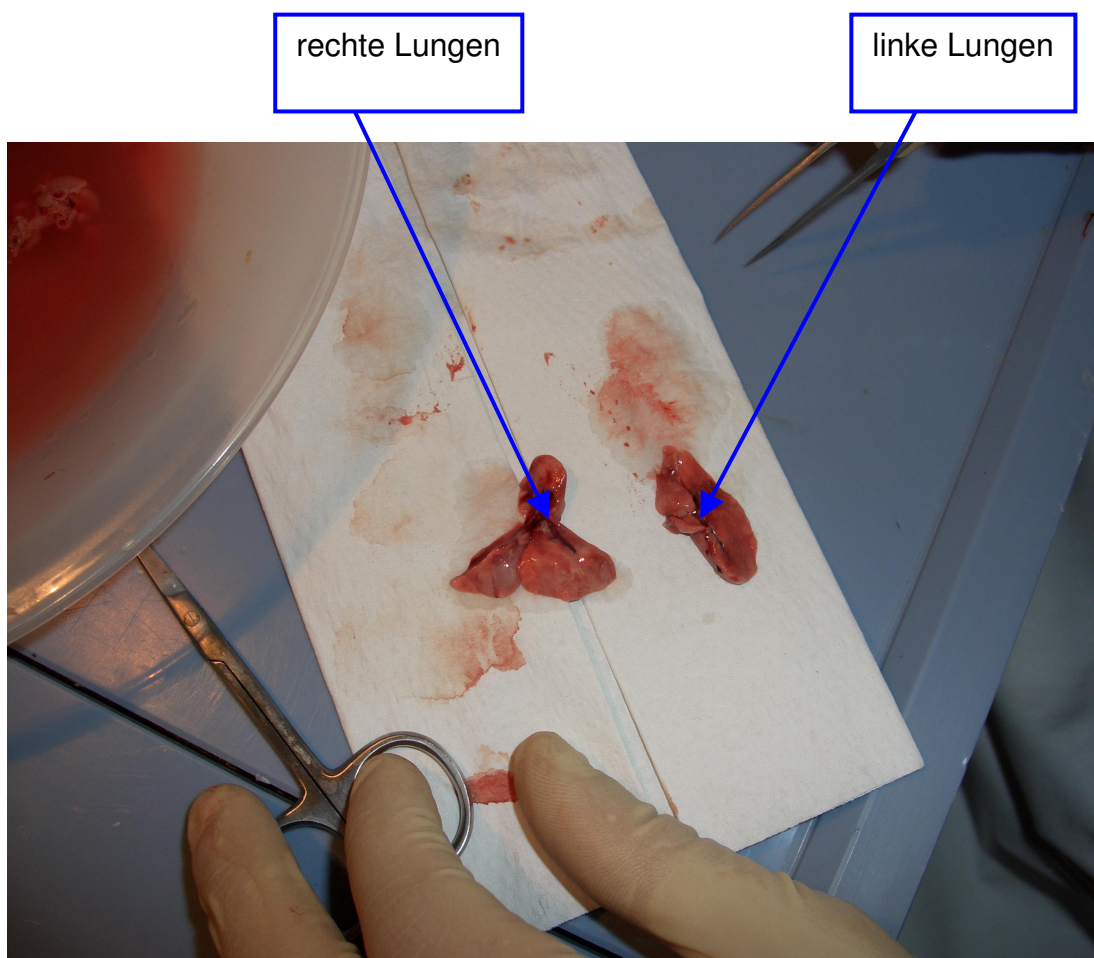


Bild 5: Darstellung der beiden Lungenflügel.

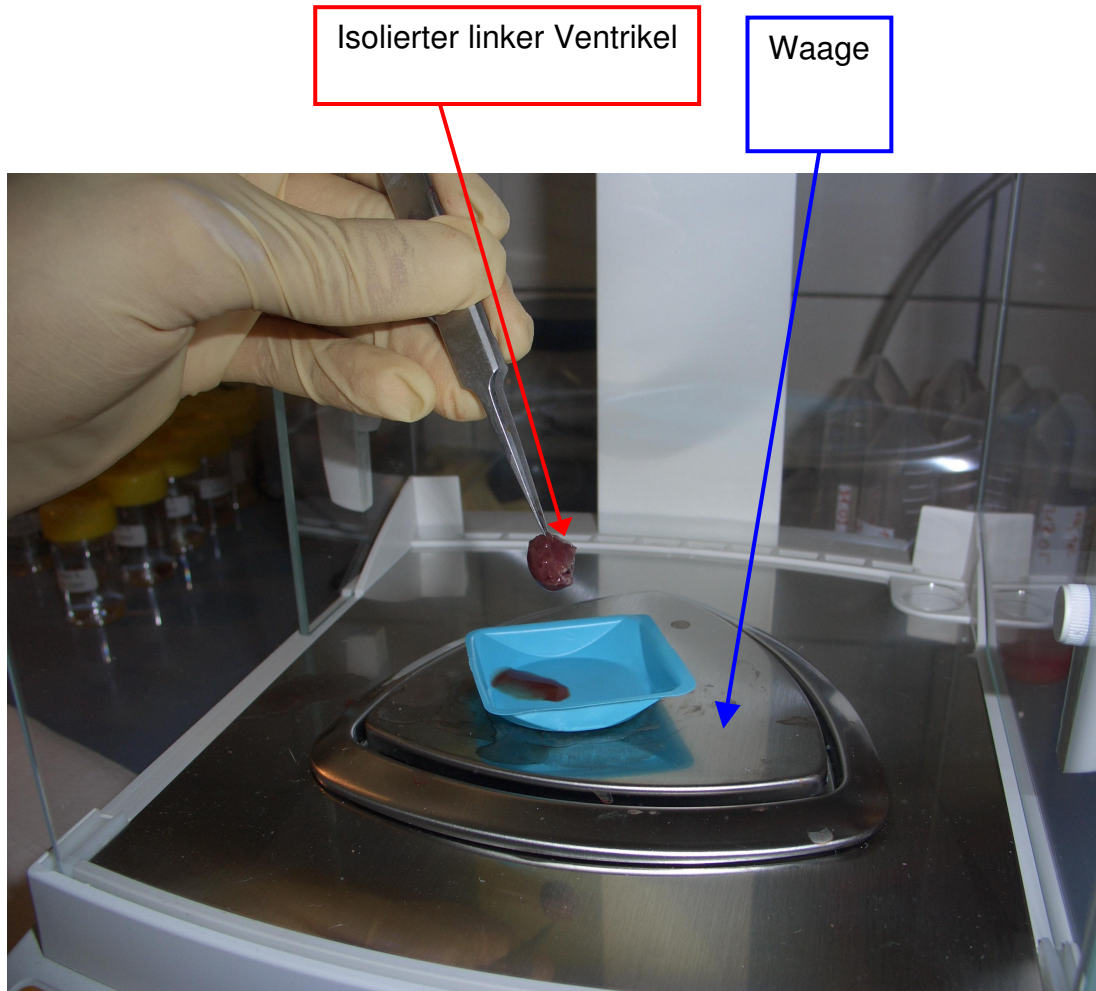


Bild 6: Bestimmung des Ventrikelgewichtes auf der Sartorius Waage.

5.3 Morphometrie

5.3.1. Präanalytik

a) Herstellung des Gewebeschnittes

Die folgenden Schritte dienen der Herstellung von Gewebeschnitten für die histomorphometrische Analytik. Als Erstes wurde das Herzgewebe über Nacht mit einer aufsteigenden Alkoholreihe über 12 h entwässert (jeweils 2 h in Ethanol 70% —> Ethanol 80% —> Ethanol 90% —> Ethanol 100% —> 2x Xylol) und am Ende in flüssiges Paraffin überführt. Damit das Myokardgewebe angeschnitten werden konnte, musste die gewünschte Schnittfläche des entwässerten Gewebes auf den Grund einer Passform gedrückt und mit Paraffin übergossen werden. Der Behälter stand dabei auf einer Kühlplatte, die das Paraffin sofort verfestigte. Der gekühlte Block wurde anschließend solange mit einem Rotationsmikrotom Modell 1130/Biocut (Reichert Jung, Nussloch, Germany) angeschnitten, bis das Myokardgewebe in dem Paraffinblock zum Vorschein kam. Nun wurde die gewünschte Schichtdicke von 5 µm eingestellt. Es wurden jeweils 3 Gewebeschnitte aus zwei Ebenen gewonnen, wobei die beiden Ebenen einen Abstand von 100 µm aufwiesen. Diese Paraffinschnitte wurden dann in ein Wasserbad gelegt und anschließend auf einen Objektträger übertragen und beschriftet. Bei 67 °C wurden die Objektträger erwärmt, um das Gewebe von Paraffin zu befreien. Am nächsten Tag erfolgte dann die Färbung des Gewebes.

b) Mastzellfärbung

Für die Färbung der Mastzellen wurde der Farbstoff Toluidin (Sigma, Taufkirchen, Germany) verwendet, da diese Substanz mit der Mastzellgranula eine unlösliche chemische Bindung eingeht. Zunächst wurde der Gewebeschnitt in einer absteigenden Alkoholreihe (s.u.) der wässrigen Toluidinlösung angepasst.

Absteigende Alkoholreihe:

- 3x 10 min Xylol
- 3x 2 min Alkohol 96%
- 1x 2 min Alkohol 70%
- 1x 5 min Alkohol 30%
- 1x 5 min in Aqua dest. Spülen

Direkt im Anschluss wurde der Gewebeschnitt in einer 0,001% wässrigen Toluidin-Lösung (10mg Toluidinpulver auf 1L Aqua dest.) für die Dauer von 30 min inkubiert. Um zu verhindern, dass das Präparat durch den Alkohol verschmiert wird, war eine leichte Entfärbung in Aqua dest. für 5 min notwendig. Eine Entfärbung der Mastzellgranula war hingegen nicht möglich, da das Toluidin über eine Schwefelverbindung fest an die Mastzellgranula gebunden ist. In den letzten Schritten wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s.u) entwässert und damit haltbar gemacht.

Aufsteigende Alkoholreihe :

- 1x 4 min 30% Alkohol
- 1x 2 min 70% Alkohol
- 1x 1 min 80% Alkohol
- 1x 1 min 96% Alkohol
- 3x 10 min Xylol

Zum Schluss wurde ein Deckglas mit Hilfe von Corbit-Balsam an den Gewebeschnitt fixiert. In Vorversuchen wurde die Färbung so abgestimmt, dass bei minimaler Färbung des umliegenden Gewebes eine optimale Färbung der Mastzellen erreicht wurde. Dabei waren die Zellgrenzen sowie der Zellkern gut erkennbar und die Granula deutlich angefärbt. Alle anderen Strukturen traten durch diese Färbung im mikroskopischen Bild in den Hintergrund, was Voraussetzung für eine gute Zelldifferenzierung war (s. Bild 7).

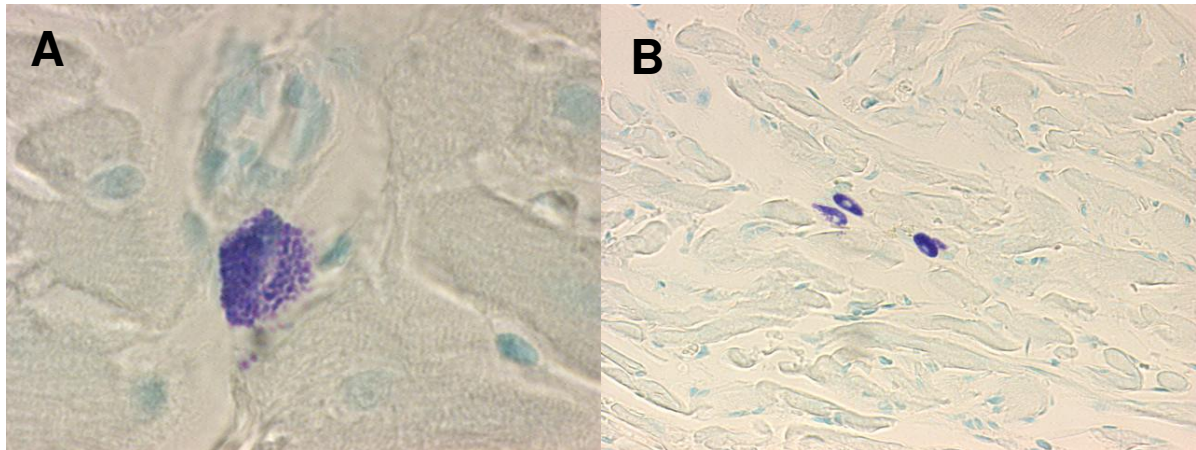


Bild 7: Mastzelldarstellung in 40x (A) und 10x (B) Vergrößerung. Zellkern und Granula sind deutlich erkennbar.

c) Kollagenfärbung

Für die Färbung des Kollagens wurde der Farbstoff Sirius-Red (Sigma, Taufkirchen, Germany) verwendet. Zur Herstellung der Siruis-Red Lösung wurde 32 ml Aqua dest. mit 1,2% Picrinsäure auf 500 ml aufgefüllt. Dann wurde mit Hilfe von 10 M NaOH ein pH von 2 eingestellt und anschließend 0,5 g Sirius-Red hinzugegeben. Über Nacht wurde die Lösung bei Dunkelheit gerührt.

Für die Färbung wurden die oben bereits beschriebenen Gewebeschnitte verwendet.

Die Färbung begann mit der absteigenden Alkoholreihe:

- 3x 10 min Xylol
- 3x 2 min Alkohol 96%
- 1x 2 min Alkohol 70%
- 1x 5 min Alkohol 30%
- 1x 5 min in Aqua dest.
- 1x 10 min in Aqua dest.

Anschließend erfolgte eine 60 minütige Inkubation in der Sirius-Red-Lösung unter Ausschluss von Licht. Beendet wurde die Färbung durch Überführung des Gewebes in 0,01 M Salzsäure. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (s.u.) wurden die gefärbten Schnitte mit Hilfe von Corbit-Balsam und einem Deckglas auf dem Objektträger fixiert (s. Bild 8 und 9).

Aufsteigende Alkoholreihe: 1x 2 min 80% Alkohol
 1x 2 min 96% Alkohol
 3x 10 min Xylol

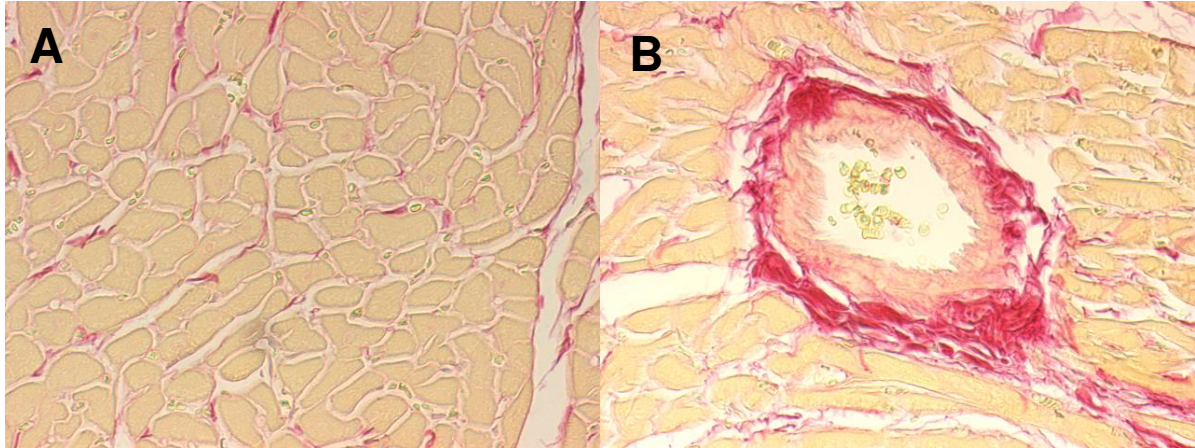


Bild 8 und 9 : Myokardgewebe mit Färbung von interstitiellem (A) und perivaskulärem (B) Kollagen.

5.3.2. Analytik

Die Vermessung der histologischen Gewebeschnitte wurde verblindet durchgeführt:

a) Mastzellen

Pro Tier wurde aus 2 Ebenen jeweils ein Gewebeschnitt analysiert. In jedem der beiden Gewebeschnitte wurde die gesamte Zahl an Mastzellen mit dem Axioskop 2 plus (Carl-Zeiss, Köln, Deutschland) und Plan-Neofluor 16x Zeiss Objektiv (Carl-Zeiss, Köln, Deutschland) ausgezählt und durch die Fläche des analysierten Gewebes dividiert. Der Quotient trägt die Einheit $1/\mu\text{m}^2$. Dabei galten folgende Kriterien: Mastzellen mussten klar erkennbar Zellkern oder Zellgrenzen aufweisen und mindestens 20 μm Abstand zum Geweberand haben.

b) Interstitielles und perivaskuläres Kollagen

Das durch Sirius-Red angefärbte Kollagen wurde mit Hilfe von Zeiss Geräten histomorphometrisch quantifiziert:

- Mikroskop: Axioskop 2 plus (Carl-Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- Objektiv: Plan-Neofluor 16x Zeiss (Carl-Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- Messprogramm: Axiovision (Carl-Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- Kamera: E-Donpisha, SONY 3CCD Farbkamera XC-003/003P (Sony, Köln, Deutschland)

Auch hier wurden pro Tier je zwei Schnitte aus zwei Ebenen analysiert, in denen jeweils 15 Gewebeausschnitte vermessen wurden. Dabei ergaben Vorversuche bei einem Durchschnitt aus 30 Gewebeausschnitten eine Abweichung von weniger als 1%, die im Wesentlichen durch die unregelmäßige Verteilung des Kollagens bedingt war.

Als Maßzahl für interstitielles Kollagen gilt der Quotient der Kollagenfläche durch die Myokardzell-Fläche. Für das perivaskuläre Kollagen mussten die Gefäße eine Größe zwischen 50-200 μm Durchmesser haben. Angegeben wurde das interstitielle Kollagen als Quotient (Perivaskuläre-Kollagenfläche/ Lumenfläche des Gefäßes + Gefäßfläche). Maßgebend war die Abstimmung der Färbung mit dem Messprogramm.

5.4 Biochemische Blutanalysen

5.4.1. Präanalytik: Blutentnahme

Vor Beginn der Fütterung wurde Blut aus dem retrobulbären Venenplexus des nasalen Augenwinkels mithilfe einer heparinisierten Kapillare entnommen. Am Ende der Fütterung wurde das Blut wie oben beschrieben durch Punktion des rechten Ratten-Ventrikels mit einer heparinisierten Spritze entnommen. Dadurch konnte eine wesentlich größere Blutmenge gewonnen werden. Aus dem Blut wurde in

unmittelbarem Anschluss Plasma gewonnen (Zentrifugation des Blutes für 10 min bei 3500 U/min), das für die Bestimmung von HCY, BNP, Kreatinin und B-Vitaminen verwendet wurde.

5.4.2. Analytik

a) Vitamin B12 und Folsäure

Vitamin B12 und Folsäure wurden mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay auf einem ACS: Centaur-Analysegerät (Bayer Healthcare, Fernwald, Deutschland) gemessen. Für die Überwachung von Präzision und Richtigkeit der verwendeten Methoden wurden folgende Qualitätskontroll-Materialien eingesetzt: Bio-Rad Immunoassay-Kontrolle (Chargennummer 40152) für Folsäure und Bio-Rad Immunoassay-Kontrolle (Chargennummer 40153) für B12. Für B12 betrug der Variationskoeffizient (VK) für die Präzision 4,41% und 4,41% für die Richtigkeit. Für Folsäure betrug der VK der Präzision 5,81% und für die Richtigkeit 3,46%. Der angegebene firmeneigene intra- und inter-assay Variationskoeffizient für Vitamin B12 dieser Methode beträgt 2,4% und 3%, für Folsäure 6,3% und 7,2%. Die gesetzlich vorgeschriebene Grenze der Richtigkeit von 14% für B12 bzw. 15% für Folsäure und der Variationskoeffizienten für B12 von 9% bzw. für Folsäure von 14% wurden nicht überschritten.

b) Kreatinin

Kreatinin wurde mit einer bichromatischen Messtechnik photometrisch nach der Jaffé-Methode auf einem Hitachi 917 Analysengerät (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gemessen. Für die Überwachung von Präzision und Richtigkeit der durchgeführten Methode wurde das Qualitätskontroll-Material Bio-Rad Multiquel-Kontrolle (Chargennummer 44693) für Kreatinin verwendet. Für Kreatinin betrug der Variationskoeffizient (VK) für die Präzision 2,3% und 4,63% für die Richtigkeit. Der angegebene firmeneigene intra- und interassay Variationskoeffizient für Kreatinin dieser Methode beträgt 0,7% und 2,3%. Die gesetzlich vorgeschriebene

Grenze der Richtigkeit von 10% und der Variationskoeffizienten von 6% wurden nicht überschritten.

c) Homocystein (HCY)

HCY wurde mit einem Mikropartikelimmunoassay (MEIA) auf dem Abbott AxSYM-System (Abbott Diagnostics, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland) gemessen. Für die Überwachung von Präzision und Richtigkeit der durchgeführten Methode wurde das Qualitätskontroll-Material Bio-Rad Cardiac Markers LT Kontrolle (Chargennummer 31153) für HCY verwendet. Für HCY betrug der Variationskoeffizient (VK) für die Präzision 6,2%. Der angegebene firmeneigene intra- und interassay Variationskoeffizient für HCY dieser Methode beträgt 2,1% und 2,8%.

Hohe Werte mussten wegen der bestehenden Messgrenzen verdünnt werden. Die oberen Messgrenzen lagen wie folgt: HCY: 50 µmol/ml, Folsäure.: 24 ng/ml, Vitamin B12: 2000 pg/ml.

Standardarbeitsanweisung bzw. Methoden-Standard Operating Procedure (Methoden-SOP) der Methoden a)-c) sind im Anhang beigelegt.

d) BNP (Brain-Natriuretic Peptid)

BNP wurde mittels Enzyme-Linked-Immunoassay (AssayMax Rat BNP-45, Gentaur, Brüssel, Belgien) bestimmt. Der intra- und interassay Variationskoeffizient für BNP dieser Methode beträgt 4,7% und 7,7%. Die Proben wurden auf eine mit primärem Antikörper beschichtete 96-well Platte aufgetragen. Nach 2h Inkubationszeit wurde die Platte gewaschen und der biotinylierte sekundäre Antikörper zugegeben. Nach 60 min und einem weiteren Waschvorgang wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzugefügt, das 30 min inkubierte. Im Anschluss an einen letzten Waschgang erfolgte die Auftragung eines Chromogen-Substrates, das durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase umgesetzt wurde und eine Farbreaktion hervorruft. Dieser Farbumschlag wurde dann photometrisch

bei 450 nm gemessen und mittels der Magelan Analysensoftware (Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland) ausgewertet. Die Konzentrationen wurden anhand einer mitgeführten Standardgerade errechnet. Standards als auch Plasma-Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode lag bei 20 pg/ml.

5.5 Quantitative Proteinanalysen

Für die Bestimmung des BNP im Gewebe wurde von jedem Tier je ein Gewebe-Aliquot mit einem Mörser homogenisiert und in eine Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria) aufgenommen. Aus dieser Suspension erfolgte zunächst eine Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Assay (BioRad, München, Deutschland) und dann die BNP-Messung mit der gleichen Methode, die auch bei den Plasma-Proben zum Einsatz kam. Da die Gewebe-Aliquote kein standardisiertes Gewicht hatten, wurde die BNP-Konzentration der Suspension durch die Proteinkonzentration geteilt. Dadurch konnte eine Standardisierung der Werte erreicht werden.

6 Superfusions-Experiment

Aus 3 gesunden Ratten wurde frisches linksventrikuläres Myokardgewebe gewonnen. Um den Einfluss von Narkosemitteln ausschließen zu können, wurden die Ratten zur Euthanasie dekapitiert. Aus dem Myokardgewebe wurden mit Hilfe einer Schneidevorrichtung (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, UK), je Herz mindestens 48 Gewebeschnitte gleicher Dicke (0,35mm) erzeugt. Anschließend wurden die 48 Schnitte in 48 Mini-Superfusionskammern (Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland) mit je 80 µl Fassungsvermögen überführt und für 13 Stunden mit einer Fließgeschwindigkeit von 66 µl/min mit HCY-konditioniertem RPMI-Medium¹ superfundiert. Zuvor wurde die Kammer samt Myokardgewebe 2h lang mit HCY-freiem RPMI-Medium ausgewaschen, um soweit wie möglich die Effekte der Myokardpräparation zu eliminieren. Das RPMI-Medium befand sich in 4 Messzylindern, und war mit 4 unterschiedlichen HCY-Konzentrationen konditioniert: 0, 10, 50, 200 µmol/l. Jeder Zylinder war über 8 dünne Schläuche mit jeweils 8 verschiedenen Kammern verbunden. So entstanden 4 Bedingungen à 8 Kammern ($n = 8 \text{ Gewebeschnitte} \times 3 \text{ Ratten} \Rightarrow n = 24$). Das RPMI-Medium wurde mit Hilfe von Pumpen (High Precision Multichannel Pumps von Isamtec, Wertheim, Deutschland) zu den Kammern geleitet. Dabei befanden sich Kammer und Auffangbehälter in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C (s. Bild 10).

¹ Superfusionsmedium: 10,39g RPMI-Pulver (RPMI 1640 Sigma), 5,96 g HEPES (Pufferan 99% Roth), 0,1 g Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure Merck), 50 ml FCS (Foetal Calf Serum PAA), 10 ml Pen/Strep (Penicillin + Streptomycin Gibco), 4 ml Cibrobay (Ciprofloxacin Bayer), 650 ml Ca²⁺-Cl₂ (Merck), 2 microliter ME (2 Mercaptoethanol Sigma)

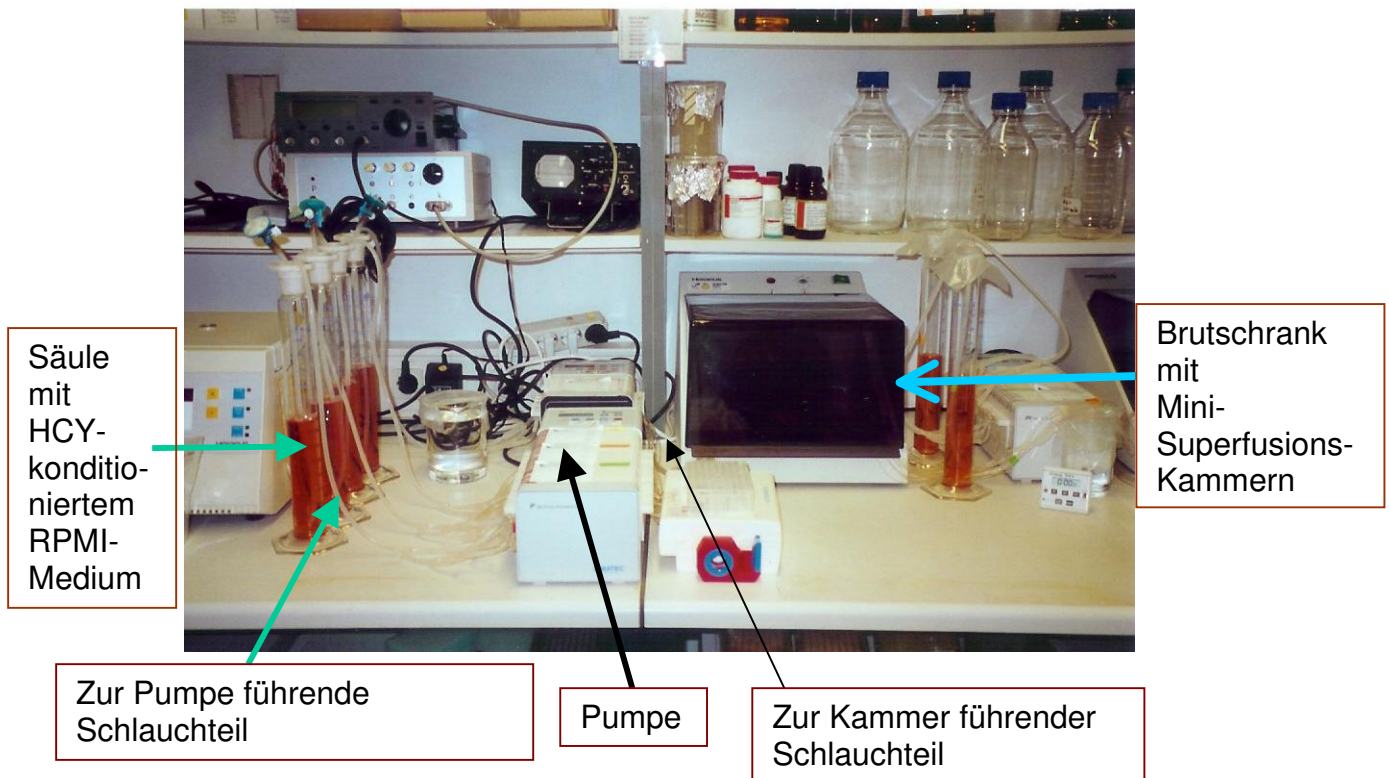


Bild 10: Aufbau des Superfusionsversuches.

Das abfließende Superfusat wurde zu den Zeitpunkten: 2, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 h in Portionen à 250 µl gesammelt (s. Bild 11).

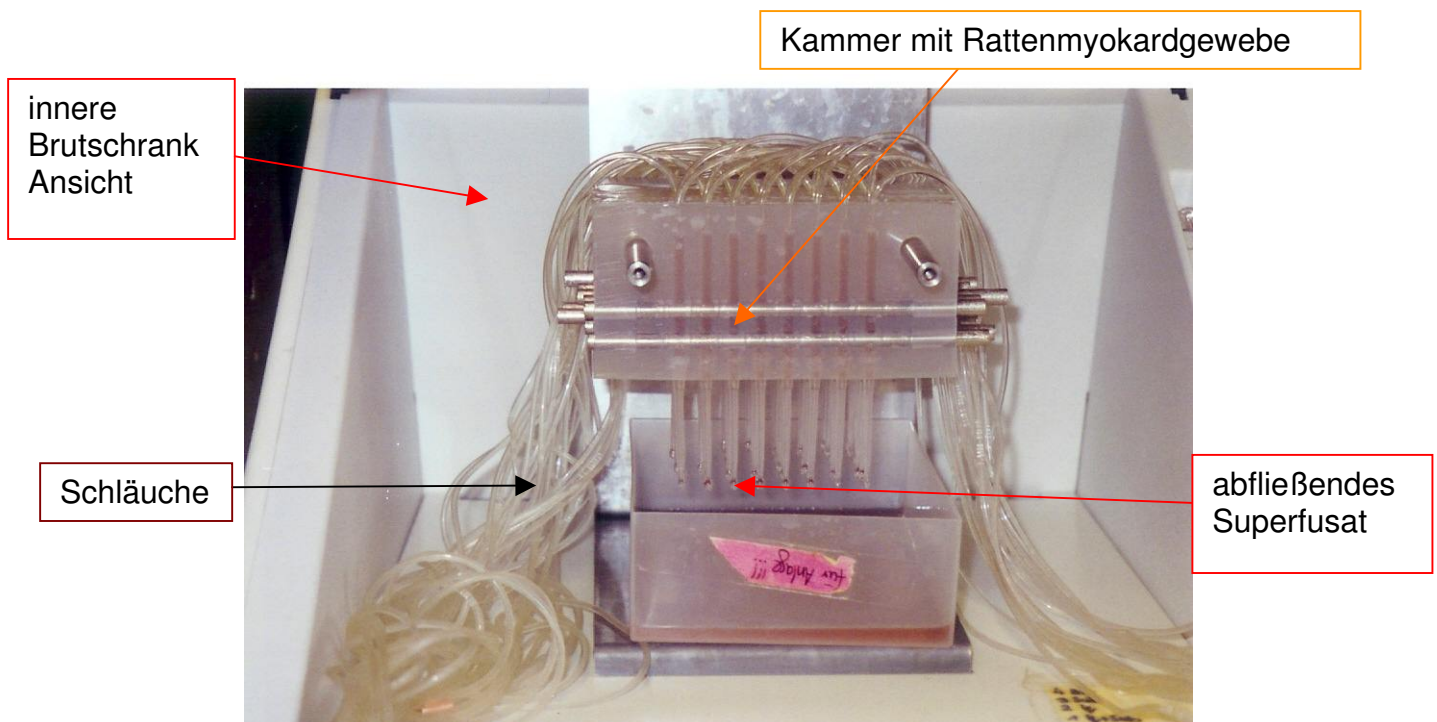


Bild 11: Ansicht des Brutschrankinneren. Die Schläuche verbinden die außerhalb des Brutschrankes stehenden Superfusionsmedium-Zylinder mit den Superfusionskammern innerhalb des Brutschrankes.

Zwischen jedem Versuchsdurchlauf wurde mit einem Spülmedium gereinigt. Am Versuchsende wurde das Gewebe in Stickstoff schockgefroren und zusammen mit dem Superfusat zur weiteren BNP-Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Daraufhin wurde die BNP-Messung, wie in Kapitel 5.4.2. d) beschrieben, bestimmt und aus den Gewebeschnitten der Proteingehalt wie in Kapitel 5.5. beschrieben gemessen. Die BNP-Sekretion wurde in $\text{pg}/\mu\text{g}$ Protein angegeben.

7 Statistik

Basierend auf den Ergebnissen des Kolmogorov-Smirnov-Test sind alle Variablen, bis auf das Gewebe-BNP, normalverteilt. Die deskriptive Statistik wurde mit Hilfe von Mittelwert \pm Standardabweichung beschrieben. Gruppenvergleiche der normalverteilten Variablen wurden mit dem one-way ANOVA und LSD post-hoc Test durchgeführt. Das Gewebe-BNP, welches nicht normal verteilt ist, wurde mit dem Kruskal-Wallis oder Mann-Whitney Test auf Signifikanz geprüft. Zur Bestimmung der Korrelationen von nicht-parametrisch verteilten Daten wurden der Spearman-Rho-Test angewendet. Alle Auswertungen wurden mit der SPSS 11.0 Programmpaket (SPSS INC., Chicago, USA) vorgenommen.

IV Ergebnisse

1 Ausgangscharakteristika

Alle untersuchten Tiere wiesen vor Beginn der Fütterung vergleichbare Ausgangswerte auf. Eine Ausnahme bildete das Körpergewicht (KG) der Methionin-Gruppe. Bedingt durch die Randomisierung wiesen diese Tiere ein signifikant niedriges KG auf. Die HCY-Plasmakonzentration lag bei allen Tieren deutlich unter $< 10 \mu\text{mol/l}$ (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) des Körpergewichtes und wesentlicher Plasma-Parameter vor Beginn der Fütterung

Gruppe	Körpergewicht (g)	Homocystein ($\mu\text{mol/l}$)	Folsäure (ng/ml)	Vitamin-B12 (pg/ml)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)
Ko 1	243 ± 36	$6,3 \pm 0,7$	—	—	$47,7 \pm 7,1$
Met	$206^{**} \pm 13$	$3,1^{**} \pm 1,6$	—	—	$50,4 \pm 10$
Homo 1%	237 ± 23	$5,9 \pm 0,84$	—	—	$54,8 \pm 12,4$
Ko 2	242 ± 9	$4,9 \pm 1,8$	$51,2 \pm 13,0$	1253 ± 148	$39 \pm 4,4$
Homo 2%	243 ± 10	$3,8 \pm 1,2$	$50,8 \pm 3,1$	1151 ± 148	$38 \pm 4,4$

******vs. andere Gruppen $p < 0,001$

3 Tiere der Ko2-Gruppe wiesen erhöhte HCY-Werte von $> 10 \mu\text{mol/l}$ auf und mussten deshalb aus der Studie ausgeschlossen werden. Aus der Homo 2%-Gruppe wurden ebenfalls 2 Tiere ausgeschlossen, da sie im Gegensatz zu allen HHCY-Tieren am Ende der Diät keine relevante Hyperhomocysteinämie aufwiesen ($< 10 \mu\text{mol/l}$).

2 Nahrungsaufnahme und Körpergewicht

Die mittlere Nahrungsaufnahme der Ratten betrug $17,1 \pm 3,3$ g/d und wies zwischen den Gruppen zum Teil signifikante Unterschiede auf. Insbesondere die Met- und Homo 2%-Gruppen zeigten eine signifikant niedrigere Nahrungsaufnahme im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (s. Abbildung 7). Dabei verhielt sich das KG proportional zur Nahrungsaufnahme.

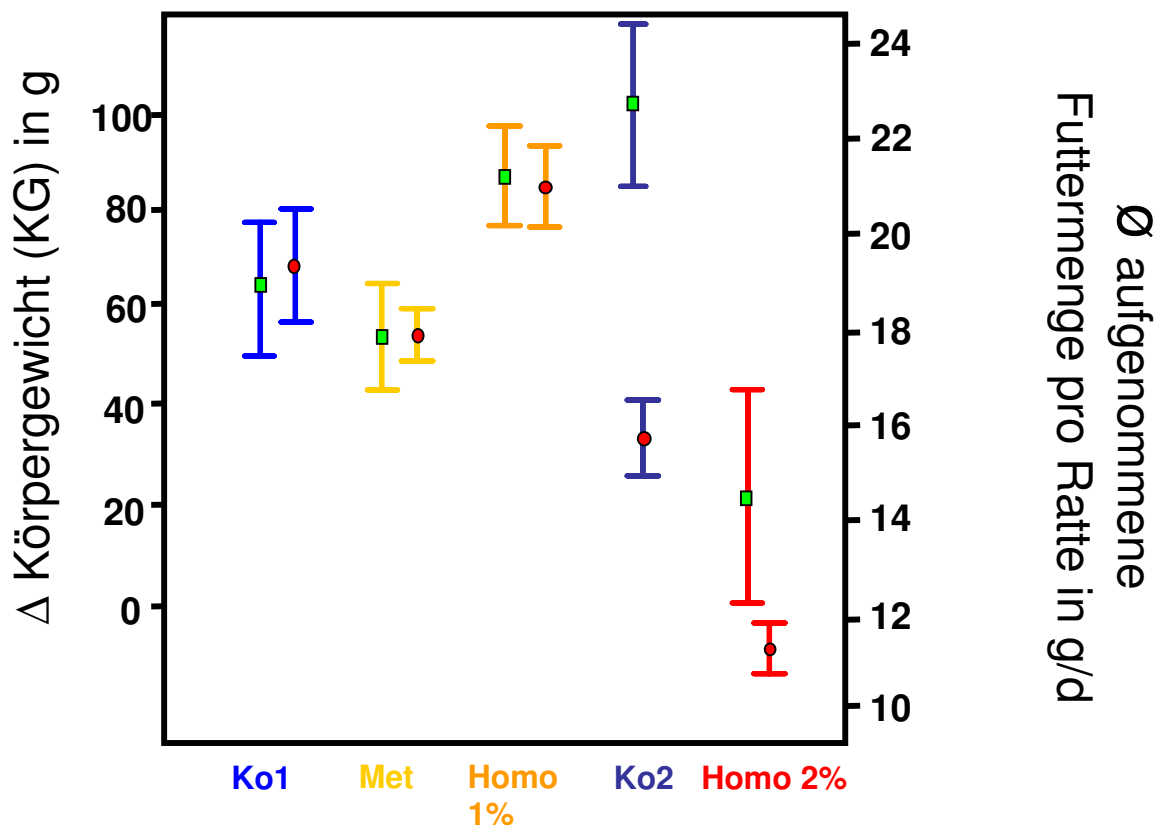


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt das KG nach 12 Wochen Fütterung im Verhältnis zur mittleren Nahrungsaufnahme.

- = durchschnittlich aufgenommene Futtermenge pro Ratte in g/d
- = durchschnittliches Körpergewicht (KG) in g

Bei der Betrachtung des KG der Met-Gruppe muss allerdings darauf geachtet werden, dass diese Gruppe bereits vor Beginn der Fütterung ein signifikant niedrigeres KG aufwies, was zufällig durch die Randomisierung der Tiere verursacht wurde (s. Tabelle 6). Bei der Zunahme des Körpergewichts während der Versuchsdauer ergab sich für die Met-Gruppe kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

Vergleicht man den 1. und den 2. Versuchsdurchlauf so fällt auf, dass die Tiere des 2. Versuchsdurchlaufs deutlich weniger Futter aufgenommen haben (s.

Tabelle 6). Dieser Unterschied ist vermutlich durch die höhere Kalorien-Menge in der Basisdiät C1000 (s. Material und Methodik, Kapitel 3: Diäten) zu erklären, und spiegelt sich auch im höheren KG t_{12} der Ko2-Gruppe wider. Besonders auffallend war die niedrige Futteraufnahme und die sehr geringe Gewichtszunahme in der Homo 2%-Gruppe ($p < 0,001$).

Tabelle 6 : Nahrungsaufnahme und Körpergewichte aller Gruppen

Gruppe	Mittlere Nahrungsaufnahme pro Ratte (g/d)	Ausgangsgewicht t_0 (g)	Endgewicht t_{12} (g)	Δ Körpergewicht (g)
Ko 1	$19,2 \pm 1,8$	243 ± 36	306 ± 20	63 ± 19
Met	$17,3 \pm 1$	$206^{**} \pm 13$	$259^{**} \pm 17$	53 ± 15
Homo 1%	$20,7 \pm 1,8$	237 ± 23	322 ± 17	$85^* \pm 14$
Ko 2	$16,3 \pm 1,5$	242 ± 9	345 ± 28	100 ± 28
Homo 2%	$12,2^{**} \pm 0,7$	243 ± 10	$254^{**} \pm 28$	$8,5^{**} \pm 25$

** vs. Ko 1, $p < 0,001$; * vs. Ko 1, $p < 0,05$; \$\$ vs. Ko 2, $p < 0,001$

3 Blutdruck, Herzfrequenz und Kreatinin

Bis auf die Homo 2%-Gruppe waren systemischer Blutdruck und Herzfrequenz in allen Gruppen vergleichbar. Der mittlere systolische Blutdruck rangierte dabei zwischen 124 und 144 mmHg. Nur die Homo 2%-Gruppe zeigte eine signifikante Reduktion des systolischen Blutdrucks (124 ± 9 mmHg vs. 144 ± 8 mmHg) (s. Tabelle 7).

Da die Niere ein zentrales Organ für die Regulation des zirkulierenden HCY ist, wurde auch das Kreatinin als Marker der Nierenfunktion untersucht. Dabei ergaben sich bis auf die Homo 2%-Gruppe gleiche Werte in allen Gruppen. Allerdings wies kein Tier erhöhte Werte auf.

Tabelle 7: Blutdruck, Herzfrequenz nach (t_{12}) 3-monatiger Diät und Kreatinin vor (t_0) und nach (t_{12}) 3-monatiger Diät

Gruppe	Systemischer Blutdruck t_{12} (mmHg)	Herzfrequenz t_{12}	Kreatinin t_0 ($\mu\text{mol/l}$)	Kreatinin t_{12} ($\mu\text{mol/l}$)
Ko 1	136 \pm 12	405 \pm 25	47,7 \pm 7,1	45,1 \pm 9,7
Met	131 \pm 10	401 \pm 43	50,4 \pm 10	56,6 \pm 13,3
Homo 1%	142 \pm 10	393 \pm 27	54,8 \pm 12,4	48,6 \pm 11,5
Ko 2	144 \pm 8	391 \pm 23	39,0 \pm 4,4	47,7 \pm 2,7
Homo 2%	124 ^{\$\$} \pm 9	413 \pm 32	38,0 \pm 4,4	36,2 ^{\$} \pm 5,3

^{\$\$} vs. Ko 2, $p < 0,001$; ^{\$} vs. Ko 2, $p < 0,05$

4 Homocystein- und B-Vitamin- Plasmakonzentration

Am Ende der 3-monatigen Fütterung war ein deutlicher Anstieg der HCY-Konzentration in den Behandlungsgruppen zu beobachten, der sich zwischen der Met-Gruppe und den beiden Homocystin-Gruppen signifikant unterschied (s. Tabelle 8 und Abbildung 8).

Tabelle 8: Homocystein-Plasmakonzentration vor (t_0) und nach (t_{12}) 3-monatiger Diät

Gruppe	Homocystein t_0 ($\mu\text{mol/ml}$)	Homocystein t_{12} ($\mu\text{mol/ml}$)
Ko1	6,3 \pm 0,7	4,6 \pm 1,5
Homo 1%	5,9 \pm 0,84	40,6 ^{**} \pm 7,0
Met	3,1 \pm 1,6	27,3 ^{**} \pm 8,8
Ko2	4,9 \pm 1,8	7,0 \pm 1,6
Homo 2%	3,8 \pm 1,2	54,0 ^{**} \pm 46,0

^{**} vs. Kontrollen , $p < 0,001$

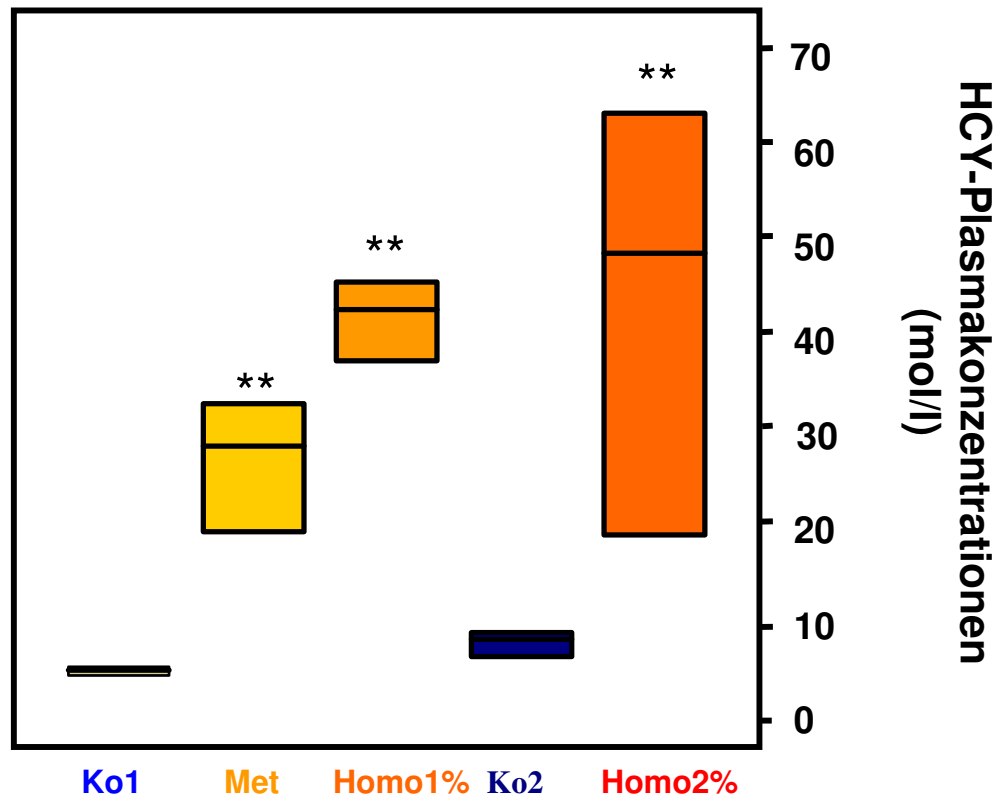


Abbildung 8: HCY-Konzentration (t12) nach 3-monatigen Diät.
 ** vs. Ko 1, $p < 0,001$

Die HHCY kann je nach Höhe des HCY-Spiegels in eine moderate (12-30 $\mu\text{mol/l}$), intermediäre (30-100 $\mu\text{mol/l}$) und schwere ($>100 \mu\text{mol/l}$) HHCY eingeteilt werden (36;116). Die Tiere der Met-Gruppe entwickelten eine moderate HHCY von $27,3 \pm 8,8 \mu\text{mol/l}$, während die Homo 1%- und Homo 2%-Gruppen intermediäre Erhöhungen des HCY von $40,6 \pm 7,0 \mu\text{mol/l}$ bzw. $54,0 \pm 46,0 \mu\text{mol/l}$ aufwiesen. Die hohe Standardabweichung in der Homo 2%-Gruppe kam durch einen Ausreißer mit 155 $\mu\text{mol/l}$ Plasma-HCY zustande.

Als Kofaktoren und Überträger der Methylgruppe nehmen die Folsäure und das Vitamin B₁₂ eine wichtige Rolle im Homocysteinestoffwechsel ein und wurden daher in die Analyse mit eingeschlossen. Dabei zeigten die Folsäure- und Vitamin B₁₂ -Plasmaspiegel keine Änderungen und unterschieden sich auch nicht zwischen den Gruppen (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: B-Vitamine vor (t_0) und nach (t_{12}) 3-monatiger Diät

Gruppe	Folsäure t_0 (ng/ml)	Folsäure t_{12} (ng/ml)	Vitamin- B ₁₂ t_0 (pg/ml)	Vitamin- B ₁₂ t_{12} (pg/ml)
Ko 1	—	53 ± 10	—	1180 ± 174
Met	—	56 ± 9	—	1132 ± 248
Homo 1%	—	55 ± 4	—	1016 ± 158
Ko 2	51 ± 13	46 ± 16	1253 ± 148	1392 ± 157
Homo 2%	51 ± 3	64 ± 13	1151 ± 148	1177 ± 353

5 BNP

BNP ist ein moderner biochemischer Marker der CHI mit einem hohen negativen prädiktiven Wert. Im Gegensatz zu allen anderen bisher dargestellten Analysen ist diese Bestimmung frei von subjektiven Einflüssen. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den HHCY-Tieren wurden in den meisten Fällen BNP-Werte unterhalb der Nachweisgrenze gefunden. Somit ist die Angabe von Mittelwerten nicht sinnvoll. Die Tiere wurden deshalb als BNP-positiv und -negativ kategorisiert. Als positiv wurde ein Tier bezeichnet, wenn der BNP-Wert > 20 pg/ml lag. Der Bereich von 20 pg/ml und darüber war mit dem verwendeten Assay zuverlässig messbar. Dabei ergaben sich bei den Kontrolltieren keine positive Tiere, während die Met-Gruppe 1 positives Tier und die Homo 1%- und Homo 2%-Gruppe jeweils 3 positive Tiere beinhalteten (s. Abbildung 9).

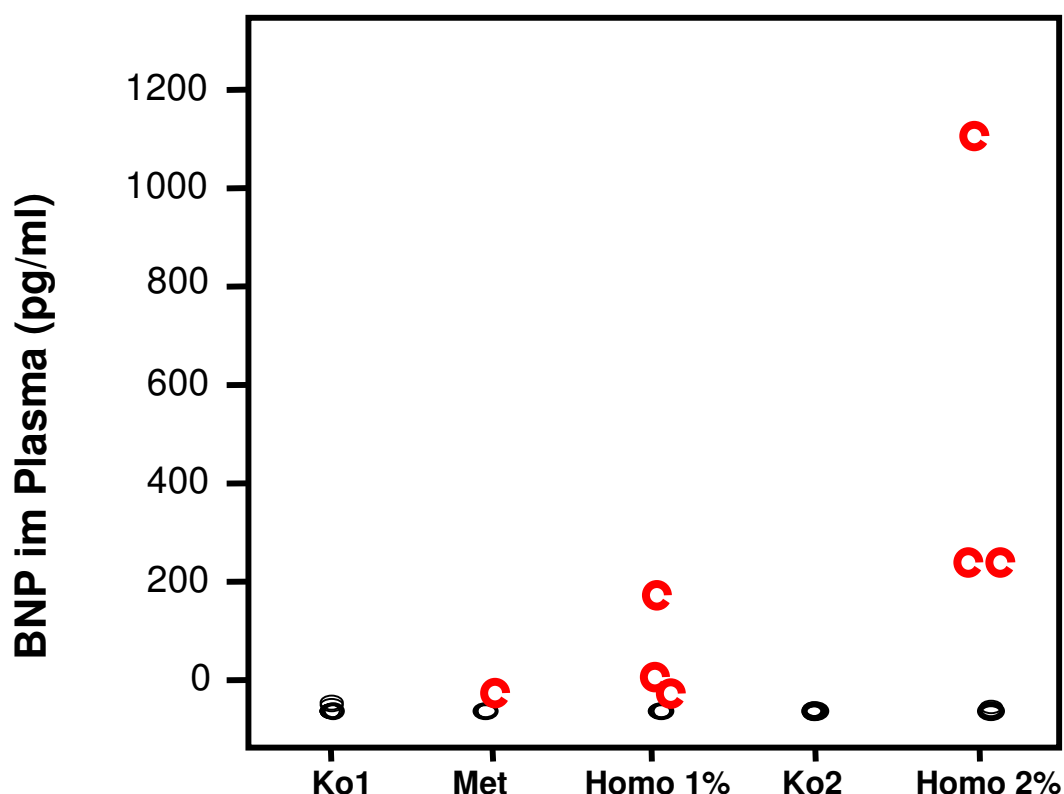


Abbildung 9: Verteilung der BNP-Plasma-Konzentrationen in den 5 Versuchsgruppen. Die roten Kreise kennzeichnen Tiere oberhalb des zuverlässig messbaren Bereiches von 20 pg/ml BNP und die schwarzen Kreise die darunter liegenden Tiere.

Trotz der analytischen Probleme im niedrigen Konzentrationsbereich konnte mit Hilfe des Pearsons Chi-Quadrat Testes eine signifikante Relation zwischen dem zirkulierenden HCY und dem Plasma-BNP gezeigt werden ($\chi^2=7,89$, $p=0,048$). Gruppiert man alle Kontrollen und alle HHCY-Gruppen, erhält man eine höhere Anzahl an positive BNP-Messungen und damit ein noch klareres Ergebnis ($\chi^2=5.03$, $p=0.025$). Trotz allem bleibt aufgrund der vielen BNP-negativen Tiere das Ergebnis der Plasma-BNP-Messungen mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor behaftet. Zur Absicherung dieses Resultates wurde deshalb zusätzlich die BNP-Konzentration im Gewebe quantifiziert (s. Abbildung 10 und Tabelle 10). Dabei ergab sich in der Homo 1%-Gruppe eine um das Doppelte höhere Konzentration als in der Kontrollgruppe ($p=0,049$). Eine vergleichbare Erhöhung fand sich in der Homo 2%-Gruppe, die aber aufgrund der größeren Streuung das Signifikanzniveau knapp verfehlte ($p=0,121$). Die Methionin-Gruppe wies keinen Unterschied zur Kontrolle auf.

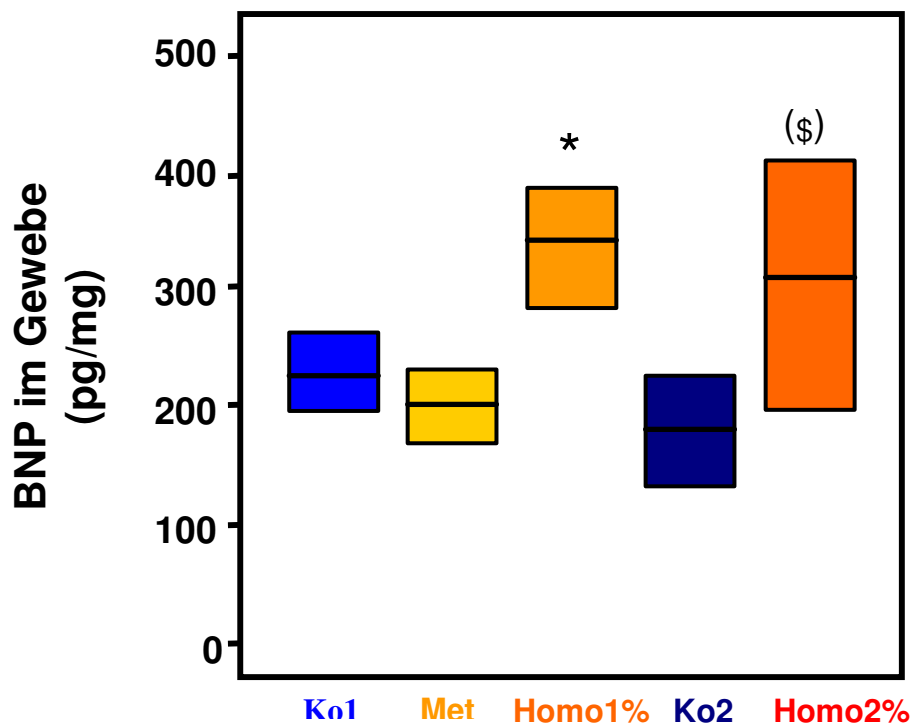


Abbildung 10: BNP-Konzentration im Myokardgewebe. Zur Homogenisierung der Ergebnisse wurde der Messwert aus jedem Aliquot durch das Proteingewicht des entsprechenden Aliquots geteilt und in pg/mg Protein angegeben.

* vs. Ko 1, $p<0,05$; (\$) vs. Ko 2, $p<0,15$;

Tabelle 10: BNP-Konzentration im Myokardgewebe

Gruppe	BNP im Myokardgewebe (pg/mg)
Ko 1	214 ± 47
Met	187 ± 45
Homo 1%	319* ± 107
Ko 2	195± 93
Homo 2%	300 ^(\$) ± 123

* vs. Ko 1, p<0,05; ^(\$) vs. Ko 2, p<0,15;

6 Organparameter

a) Ventrikelgewicht

Eine CHI ist regelmäßig durch eine Hypertrophie und Dilatation des Herzens gekennzeichnet, was sich unter anderem in einem erhöhten Organgewicht widerspiegelt. Zur Erfassung einer eventuellen Hypertrophie wurde in den Versuchstieren das Gewicht des linken Ventrikels bestimmt. Das absolute mittlere Ventrikelgewicht war in der Met-Gruppe und in der Homo 2%-Gruppe signifikant niedriger als in den jeweiligen Kontrollen (s. Tabelle 11 und Abbildung 11A). Da das Herz- und damit auch das Ventrikelgewicht aber stark vom Körpergewicht abhängen und die Met- sowie die Homo 2%-Gruppe ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als alle anderen Gruppen aufwiesen (s. Tabelle 5), ist das niedrigere Ventrikelgewicht in diesen beiden Gruppen (s. Tabelle 11) von fraglicher Relevanz.

Tabelle 11: Ventrikelgewicht

Gruppe	Ventrikelgewicht (g)	relatives Ventrikel-gewicht (100*[g/g KG])
Ko1	0,79 ± 0,06	2,58 ± 0,13
Met	0,66** ± 0,05	2,56 ± 0,12
Homo1%	0,90 ± 0,06	2,64 ± 0,28
Ko 2	0,85 ± 0,08	2,62 ± 0,21
Homo 2%	0,77 ^{\$} ± 0,09	3,03 ^{\$\$} ± 0,27

** vs. Ko 1, p<0,001; \$\$ vs. Ko 2, p<0,001; ^{\$} vs. Ko 2, p<0,05

Zur Vermeidung dieses Problems wurde deshalb das relative Ventrikelgewicht errechnet, welches sich aus dem Ventrikelgewicht dividiert durch das Körpergewicht ergab. Nach dieser Korrekturmaßnahme waren die Erniedrigungen in den Met- und Homo 2%-Gruppen nicht mehr nachweisbar. Im Gegenteil, in der Homo 2%-Gruppe ergab sich eine deutliche Zunahme des Ventrikelgewichts (p=0,006) (s. Abbildung 11B und Tabelle 11).

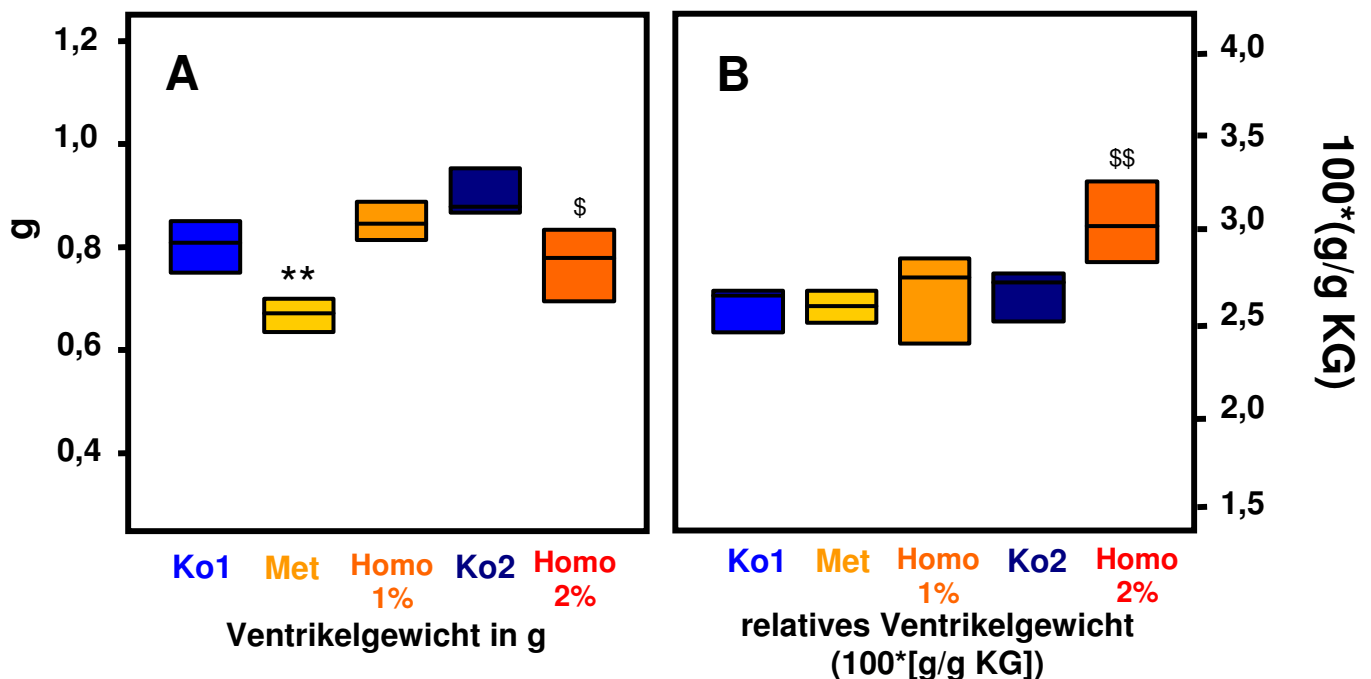


Abbildung 11: Absolutes und relatives Gewicht des linken Ventrikels. Das relative Ventrikelgewicht ist in g/g Körpergewicht (KG) angegeben. Um die Zahlen anschaulicher zu gestalten, wurden die Ergebnisse noch mit dem Faktor 100 multipliziert.

** vs. Ko 1, p<0,001; \$\$ vs. Ko 2, p<0,001; ^{\$} vs. Ko 2, p<0,05

b) Feuchtgewicht der Lungen

Da es im Rahmen einer CHI zum Rückstau von Flüssigkeit in die Lungen kommt, wurde zusätzlich das Feuchtgewicht der Lungen bestimmt. Dabei war ein ähnliches Bild wie bei den Herzen zu beobachten. In der Met-Gruppe zeigte sich erneut ein niedriges absolutes Gewicht. In der Homo 2%-Gruppe war im Mittel ebenfalls ein geringeres Lungengewicht zu beobachten, was jedoch nicht das Signifikanzniveau erreicht (s. Tabelle 12 und Abbildung 12A). Vergleichbar dem Herzen hängt auch die Größe und das Gewicht der Lungen vom Körpergewicht ab. Deshalb muss auch in diesem Fall für das KG korrigiert werden. Das relative Lungengewicht berechnet sich demnach aus dem Lungengewicht dividiert durch das Körpergewicht. Nach dieser Korrektur ergab sich kein Unterschied in der Met-Gruppe, aber eine signifikante Erhöhung in der Homo 2%-Gruppe ($p=0,002$) (s. Tabelle 12 und Abbildung 12B).

Tabelle 12: Feuchtgewicht der Lungen

Gruppe	Feuchtgewicht der Lunge (g)	relatives Feuchtgewicht der Lunge ($100 \cdot [g/g \text{ KG}]$)
Ko 1	$1,53 \pm 0,11$	$5,03 \pm 0,51$
Met	$1,38^* \pm 0,13$	$5,33 \pm 0,38$
Homo 1%	$1,60 \pm 0,13$	$4,98 \pm 0,55$
Ko 2	$1,73 \pm 0,14$	$5,05 \pm 0,55$
Homo 2%	$1,64 \pm 0,2$	$6,5^{**} \pm 0,86$

*vs. Ko 1, $p < 0,05$; ** vs. Ko 2, $p < 0,001$;

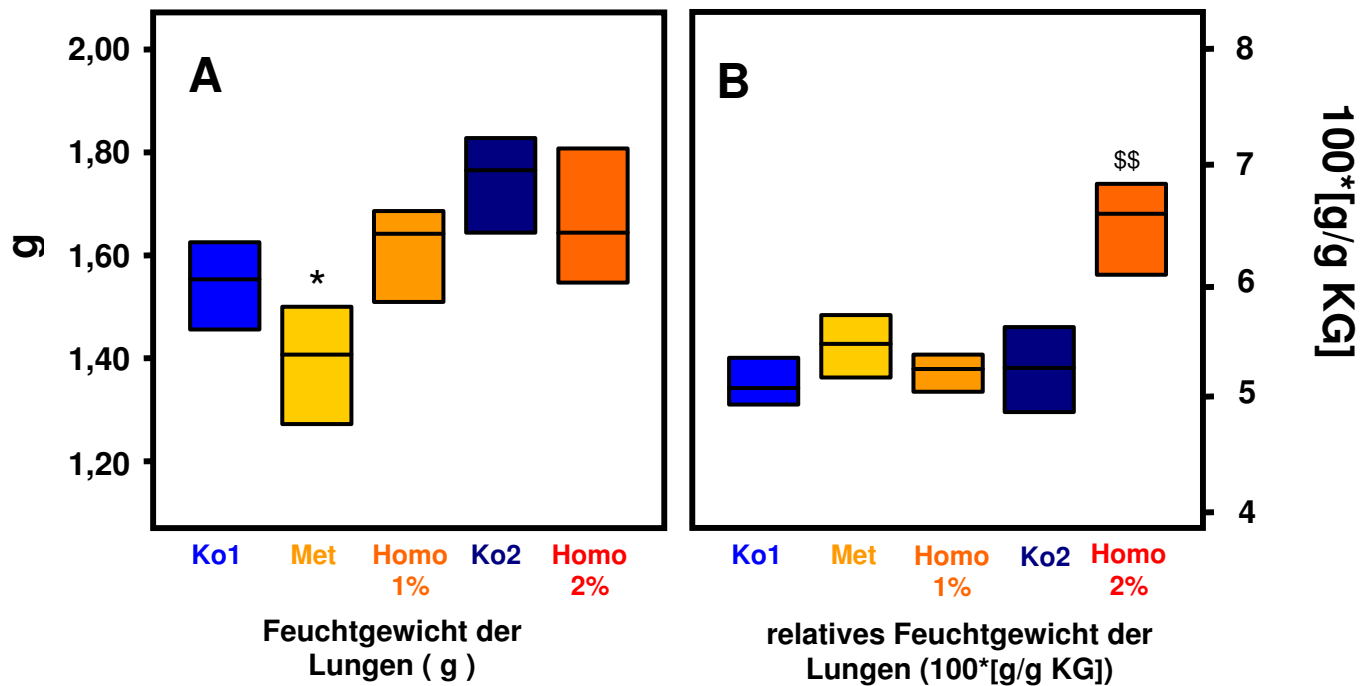


Abbildung 12: Absolutes und relatives Gewicht der Lungen. Das relative Lungengewicht ist in g/g Körpergewicht (KG) angegeben. Um die Zahlen anschaulicher zu gestalten, wurden die Ergebnisse noch mit dem Faktor 100 multipliziert.

* vs. Ko 1, $p < 0,05$; \$\$ vs. Ko 2, $p < 0,001$

7 Histomorphometrische Daten

a) Interstitielles und perivaskuläres Kollagen

Da die Organgewichte nur ein grobes Maß für die CHI-assoziierten Veränderungen darstellen und durch die Präparation erhebliche Schwankungen unvermeidbar sind, benötigt man für eine verlässliche Beurteilung präzisere Parameter. Pathognomonisch für die CHI ist ein pathologisches Remodelling des Myokards, wobei es zu Einlagerungen von bindegewebiger Matrix kommt. Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Matrix. Es wurde deshalb im nächsten Schritt das perivaskuläre und interstitielle Kollagen im Myokard bestimmt. Dabei ergab sich eine tendenzielle Erhöhung des interstitiellen Kollagens in der Homo 2%-Gruppe, die aber knapp das Signifikanzniveau verfehlte ($p=0,132$). Das perivaskuläre Kollagen lag in dieser Gruppe im Mittel 35% über der entsprechenden Kontrollgruppe (Ko 2). Aufgrund der hohen Standardabweichung wurde aber auch hier keine Signifikanz erreicht (s. Tabelle 13 und Abbildung 13 A,B).

Tabelle 13: Interstitielles und perivaskuläres Kollagen

Gruppe	Interstitielles Kollagen (% pro analysierte Fläche)	Perivaskuläres Kollagen (Fläche Kollagen/Fläche Gefäßlumen in %)
Ko 1	$4,71 \pm 1,16$	$2,13 \pm 0,66$
Met	$3,74 \pm 0,84$ ^{n.s.}	$2,04 \pm 1,21$ ^{n.s.}
Homo 1%	$5,09 \pm 1,47$ ^{n.s.}	$2,08 \pm 1,03$ ^{n.s.}
Ko 2	$2,85 \pm 0,85$	$2,03 \pm 0,90$
Homo 2%	$3,54 \pm 0,81$ ^{n.s.}	$2,67 \pm 1,19$ ^{n.s.}

n.s. = nicht signifikant vs. Kontrolle 1 bzw. 2

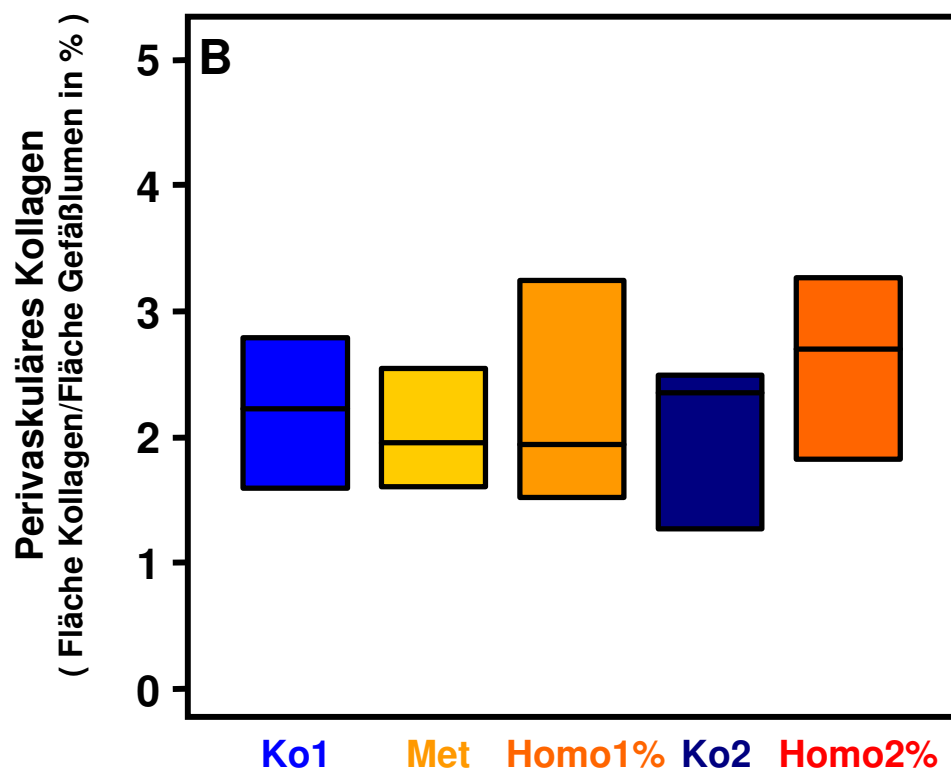
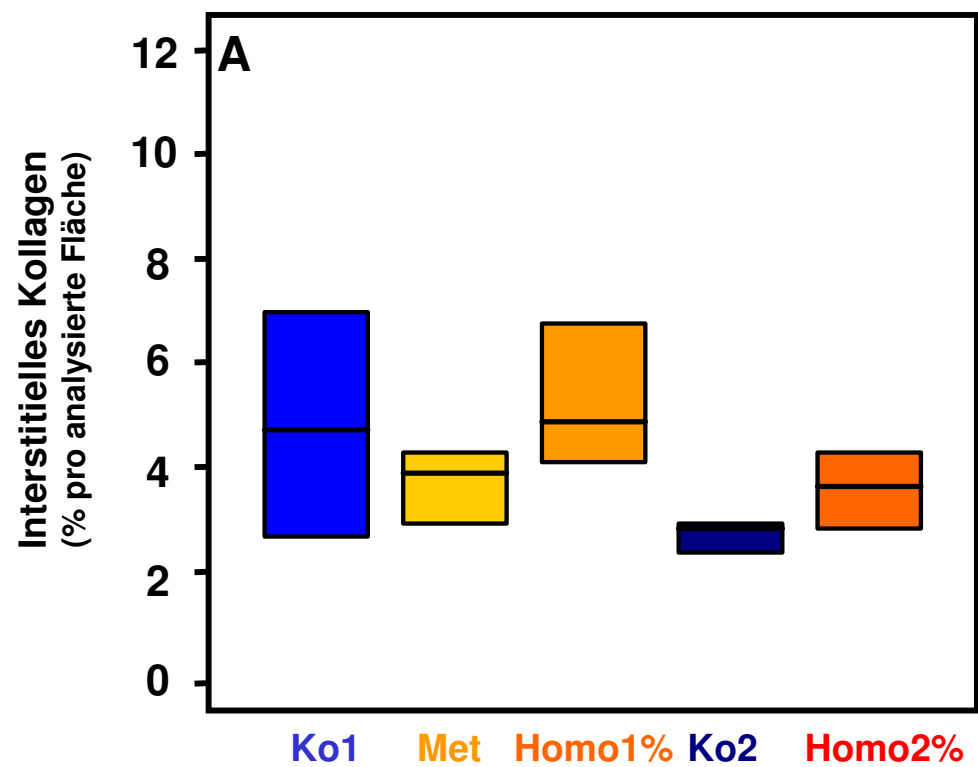


Abbildung 13: Interstitielles und perivaskuläres Kollagen im Myokard des linken Ventrikels.

b) Mastzellen

In Rahmen einer CHI kommt es auch zu einer vermehrten Mastzellinfiltration des Myokards. Es wurde deshalb bei den Versuchstieren auch die Mastzellinfiltration quantifiziert. Allerdings war kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar (s. Tabelle 14 und Abbildung 14).

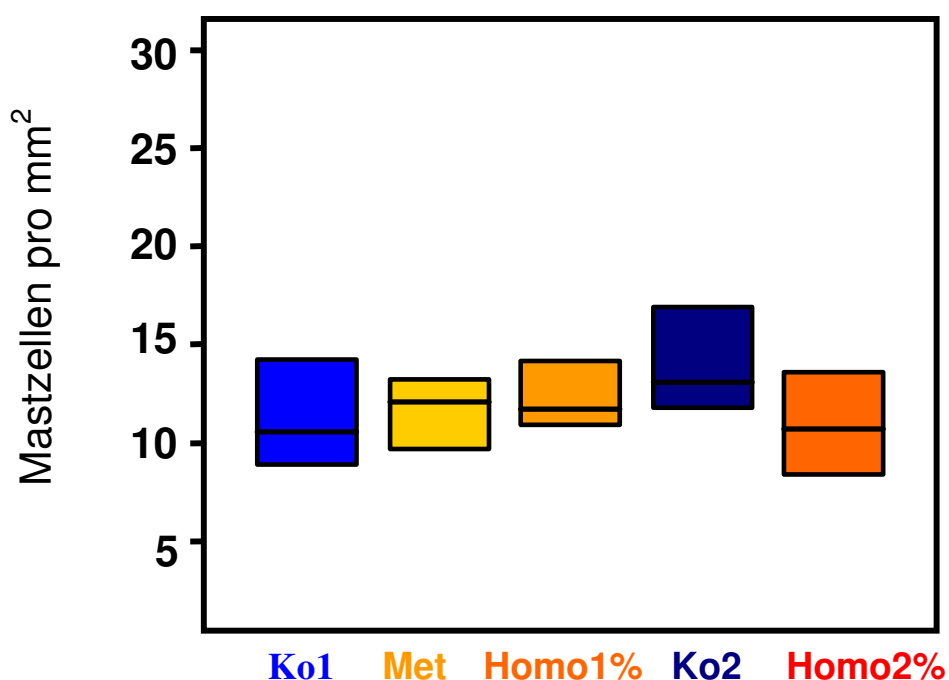


Abbildung 14: Mastzellinfiltration des Myokard (Zellen pro mm²)

Tabelle 14: Mastzellinfiltration des Myokard

Gruppe	Mastzellen pro mm ²
Ko 1	11,3 ± 3,0
Met	11,9 ± 2,4 ^{n.s.}
Homo 1%	12,6 ± 2,1 ^{n.s.}
Ko 2	14,5 ± 5,0
Homo 2%	11,8 ± 5,6 ^{n.s.}

n.s. = nicht signifikant vs. Kontrolle 1 bzw. 2

8 Superfusionsdaten

Um die oben stehenden Ergebnisse zu bestätigen und einen direkten Einfluss von HCY auf das Myokardgewebe nachzuweisen, wurden Superfusions-Experimente mit frisch präparierten Rattenmyokardgewebeschnitten durchgeführt. Die Myokardschnitte wurden mit ansteigenden HCY-Konzentrationen überflutet (superfundiert). Der Mittelwert der totalen BNP-Sekretion stieg während der 11-stündigen Superfusion mit zunehmender HCY-Konzentration im Superfusionsmedium signifikant an (s. Abbildung 15).

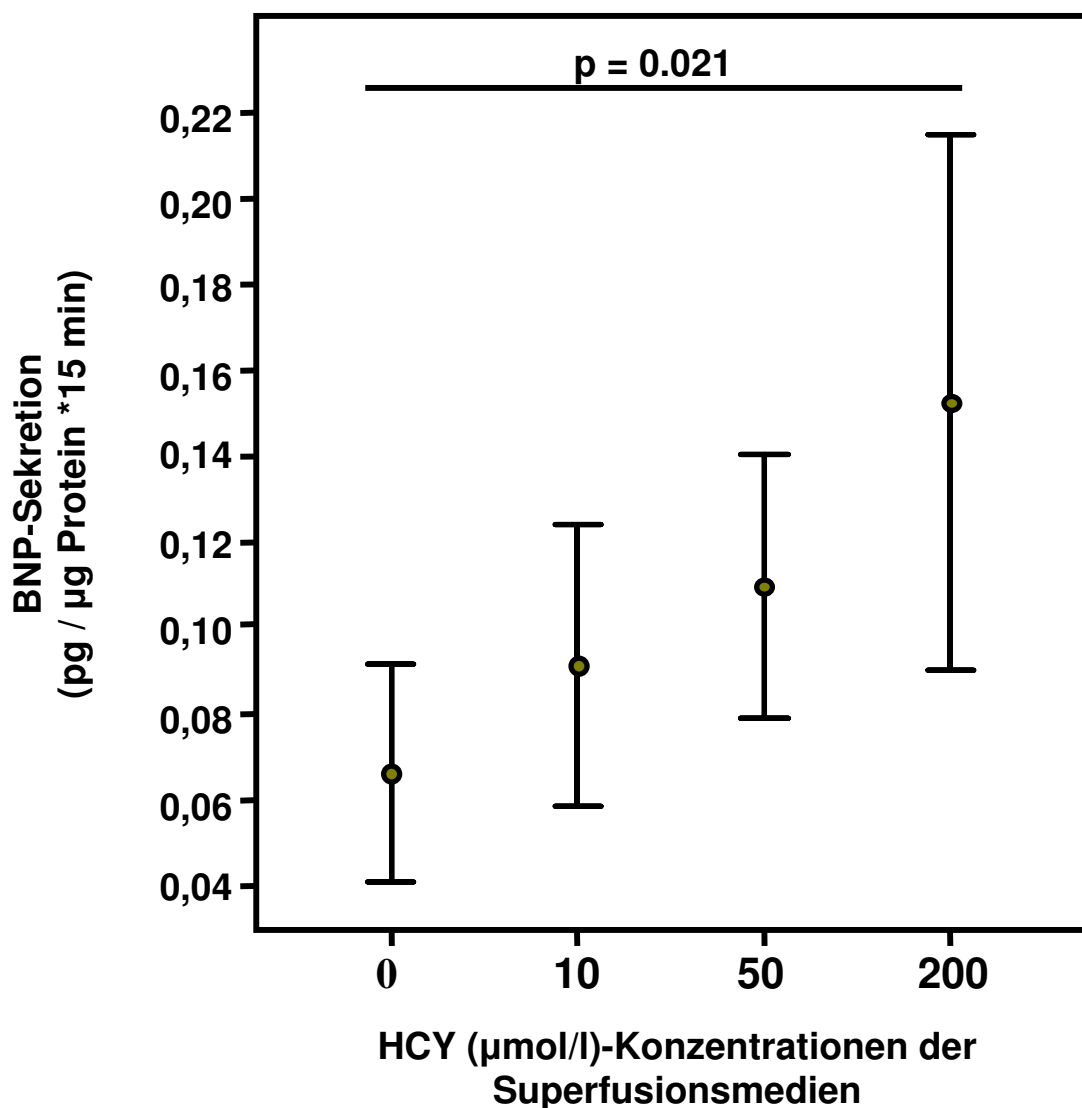


Abbildung 15: Gesamtkonzentration der BNP-Sekretion des Myokardgewebes durch HCY-Stimulation verschiedener Konzentrationen. Aus Gründen der Übersicht wurden alle Messwerte mit 100 multipliziert.

V Diskussion

Das Hauptergebnis der vorliegenden Studie war eine erhöhte BNP-Konzentration in hyperhomocysteinämischen Ratten. Die gesteigerte BNP-Konzentration war sowohl im Plasma als auch im Myokardgewebe nachweisbar. Allerdings ging die vermehrte Konzentration nicht mit einem pathologischen Remodelling des Myokards einher. Die Kausalität zwischen der BNP-Konzentration und HCY konnte in ex-vivo superfundierten ventrikulären Gewebeschnitten belegt werden. Hierbei war die BNP-Expression proportional zur HCY-Konzentration.

1 Tiermodell

In allen HHCY-Gruppen konnte mit den eingesetzten Diäten im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine signifikante Erhöhung des zirkulierenden HCY erreicht werden. Die Kontrolltiere wiesen mit einem mittleren HCY von $5,6 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$ homogen niedrige Werte auf. Diese homogenen Ausgangswerte in allen Gruppen sind eine optimale Basis für die Analyse der HHCY-induzierten Veränderungen in den Behandlungsgruppen. Anhand der HCY-Ausgangswerte aller 50 Tiere kann der Referenzbereich (2,5.-97,5. Perzentile) in weiblichen Wistar-Ratten mit $3,4\text{-}9,1 \mu\text{mol/l}$ definiert werden.

Zur Induktion einer HHCY kamen 3 verschiedene Fütterungsmodelle zum Einsatz. In Anlehnung an die von der D.A.CH.-Liga Homocystein e.V. vorgeschlagene Klassifikation der HHCY beim Menschen ([115](#)) wurde durch die 2,4%ige Methionin-Diät eine moderate HHCY erreicht. Der Methionin-Zusatz wurde von den Tieren gut toleriert. Die durchschnittlich aufgenommene Futtermenge in der Met-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der entsprechenden Kontrolle. Ein vergleichbares Modell der moderaten HHCY wurde bereits von Woo und Siow beschrieben ([133](#)). Dabei waren die HCY-Konzentrationen der vorliegenden Studie

gut mit dem von Woo und Siow beobachteten HCY-Spiegel vergleichbar (27,3 vs. 25,3 $\mu\text{mol/l}$).

In den Homo 1%- und 2%-Gruppen waren die HCY-Anstiege deutlich ausgeprägter und entsprachen einer intermediären HHCY. Auch eine intermediäre HHCY, induziert durch eine 1%-ige Homocystin-Diät, wurde bereits beschrieben (55;58). Joseph et al. verwendeten eine derartige Diät in zwei Studien, und beobachteten ähnliche HCY-Konzentrationen wie in der vorliegenden Arbeit. Während die aufgenommene Nahrungsmenge in der Homo 1%-Gruppe mit der dazugehörigen Kontrolle vergleichbar war, nahm die Homo 2%-Gruppe signifikant weniger Nahrung zu sich. Ziel der Homo 2%-Diät war es, im Vergleich zur Homo 1%-Gruppe eine noch deutlichere HHCY zu erzielen. Mit 54 vs. 40,6 $\mu\text{mol/l}$ war der Unterschied allerdings nicht deutlich erhöht. Außerdem war die Streuung der HCY-Werte unter den Tieren dieser Gruppe sehr groß. Insgesamt lassen die mangelnde Gewichtszunahme, die reduzierte Fressmenge und die starke Variation der HCY-Konzentration im Plasma auf eine eingeschränkte Verträglichkeit der Diät schließen.

Für eine suffiziente Elimination des anfallenden HCY ist eine adäquate Versorgung mit Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 nötig. Alle 3 Vitamine sind am Abbau des HCY an zentraler Stelle beteiligt. Deshalb wurden am Ende der Fütterungsperiode Folsäure und Vitamin B12 in allen Versuchstieren gemessen. Dabei zeigten alle Gruppen konstant hohe Konzentrationen an Folsäure und Vitamin B12 im Plasma. Gruppenunterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass Unterschiede im Vitaminstatus als Einflussfaktor nicht in Frage kommen. Dieser Befund untermauert außerdem die Vermutung, dass bei der Induktion des BNP im Myokard wahrscheinlich das erhöhte HCY und nicht erniedrigte Vitaminspiegel das pathogene Agens darstellen.

Neben den Vitaminen ist die Nierenfunktion ein weiterer wichtiger Einflussfaktor für den HCY-Spiegel. Durch eine eingeschränkte Nierenfunktion kommt es zu einer Akkumulation des HCY, das zum großen Teil über die Niere eliminiert wird. Um eine eingeschränkte Nierenfunktion als potenziellen Einflussfaktor bei den weiteren Betrachtungen ausschließen zu können, wurde das Plasma-Kreatinin gemessen. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine Einschränkung der Nierenfunktion.

2 BNP

Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen eine signifikante Stimulation der BNP-Expression. Dabei konnte die gesteigerte BNP-Konzentration sowohl im Plasma als auch im Myokard-Gewebe nachgewiesen werden. Eine Steigerung der BNP-Konzentration konnte aber nur in den Homo 1%- und 2%-Gruppen (intermediäre HHCY) beobachtet werden. In der Met-Gruppe fand sich keine Veränderung der BNP-Expression.

Die BNP-Messungen im Plasma zeigten in den Homo 1%- und Homo 2%-Gruppen eine schwache Erhöhung, für die aber mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests eine Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Es soll an dieser Stelle jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die BNP-Messungen im Plasma durch die unzureichende Sensitivität des verwendeten Assays limitiert waren. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 20 pg/ml. Die Folge waren nicht messbare BNP-Spiegel bei einem Großteil der untersuchten Tiere. Da BNP ein hoch speziesspezifisches Protein ist, bedarf es für die BNP-Messung eines spezifischen Ratten-BNP-Assays. Solche Tests sind allerdings ausgesprochen rar und der hier eingesetzte erwies sich als der Geeignetste. Aufgrund dieser Problematik bleibt festzustellen, dass die Plasma-BNP-Spiegel nicht als hinreichender Beweis für eine gesteigerte BNP-Konzentration anzusehen sind. Zur Absicherung der Plasma-Befunde war es somit wichtig Proben zu analysieren, deren BNP-Konzentration im gut messbaren Bereich lagen. Deshalb wurde anschließend das BNP im Myokard-Gewebe, dem Hauptort der BNP-Synthese, gemessen. Hier lagen die BNP-Konzentrationen um ein Vielfaches höher als im Plasma, und die gemessenen Werte befanden sich alle im linearen Bereich des Testes. Vergleichbar dem Ergebnis der BNP-Messungen im Plasma ergab sich auch hier ein Anstieg der BNP-Expression in den Homo 1%- und 2%-Gruppen, während die Met-Gruppe keinen Anstieg zeigte. Somit steht das Ergebnis des BNP-Vergleiches zwischen HHCY- und Kontrolltieren auf einer wesentlich solideren Basis.

Als mögliche Ursache für eine BNP-Induktion durch HCY können prinzipiell zwei Mechanismen diskutiert werden. Zum einen könnte es aufgrund des atherogenen Potenzials des HCY zu einer gestörten Perfusion und somit zu einer konsekutiven Schädigung des Myokards kommen. Andererseits ist aber auch eine

direkte Schädigung der Kardiomyozyten durch HCY denkbar. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, wurden die Superfusionsexperimente mit frisch präpariertem Rattenmyokard durchgeführt. Hauptvorteil dieser Methodik ist, dass die Kardiomyozyten in ihrem natürlichen Ambiente (extrazelluläre Matrix und Zell-Zell-Kontakt) verbleiben, aber gleichzeitig von vaskulären Effekten und komplexen Rückkopplungsmechanismen in vivo losgelöst sind. Im Gegensatz zu Zellkulturversuchen kann außerdem der interstitielle Fluss durch die Regulation der Superfusionsgeschwindigkeit imitiert werden. Die Superfusionsexperimente zeigten eine signifikante konzentrationsabhängige Steigerung der Sekretionsrate des BNP. Dabei ergab sich bei 200 µmol/l HCY im Superfusionsmedium eine Verdopplung der BNP-Freisetzung. Die Validität der Superfusionsmethode konnte in vorangegangenen Studien sowohl mit Myokard (53) als auch mit anderen Geweben, wie z.B. Milz und Synovia (85) nachgewiesen werden. Einziger Kritikpunkt bei den Superfusionsversuchen war auch hier eine oft nicht messbare BNP-Konzentration. Bei derselben Bedingung ergaben sich somit zwischen den einzelnen Schnitten erhebliche Unterschiede. Allerdings kann die Statistik durch die Vielzahl an Messpunkten als relativ verlässlich eingestuft werden. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Superfusionsexperimente eine Kausalität zwischen HCY und BNP-Expression als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen.

Die Induktion von oxidativem Stress wird durch die Verminderung der NO-Verfügbarkeit und der gesteigerten Sauerstoffradikalbildung als der primär pathologische Prozess im Rahmen der HHCY-induzierten CHI vermutet (19;110;121). Da nun im Gegensatz zum Tierversuch im Superfusionsexperiment weder Volumen, noch Druckbelastung ursächlich für die gesteigerte BNP-Sekretion waren, ist eine Induktion durch das Hinzugeben von HCY naheliegend. Diese Vermutung wird durch aktuelle Studien unterstützt, die häufig erhöhte NT-proBNP-Werte bereits vor dem Nachweis echokardiographischen Veränderungen aufzeigen (12;29). Ein möglicher Mechanismus für eine HCY-induzierte Stimulation der BNP-Sekretion ist eine Aktivierung von NFκ-B, das im Rahmen des oxidativen Stresses aktiviert wird. Diese Vermutung wird durch Studien gestützt, die eine NFκ-B induzierte BNP-Synthese bereits nachgewiesen haben (70;71). Ebenso ist im Rahmen des HHCY-induzierten oxidativen Stresses eine NFκ-B-Aktivierung nachgewiesen worden (3;4).

In einer Untersuchung an ex-vivo perfundierten Ratten-Herzen konnten Kennedy et al. negativ inotrope Effekte des HCY nachweisen, die über endotheliale Mechanismen reguliert wurden (64;65). Dabei waren die beobachteten Effekte nicht durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit bedingt. Aufgrund der aktuellen Datenlage muss also davon ausgegangen werden, dass neben direkten myokardialen Mechanismen auch vaskuläre Effekte involviert sind. Da derzeit keine weiteren tierexperimentellen oder Zellkultur-Studien, die den Zusammenhang zwischen HHCY und BNP untersuchen, verfügbar sind, ist ein Vergleich der im Rahmen dieser Promotion erhobenen Daten mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen nicht möglich. Allerdings gibt es zwei klinische Studien, die übereinstimmend eine signifikante Korrelation von HCY und NT-pro BNP fanden (2;47). Darüber hinaus ergaben diese Untersuchungen einen klaren Zusammenhang zwischen HHCY und dem Schweregrad der CHI. In einer dieser beiden Studien wurden auch die potenziellen Beziehungen der Folsäure und des Vitamin B12 mit der CHI analysiert (2). Überraschenderweise ergaben sich keine Korrelationen dieser beiden Vitamine mit dem NT-proBNP sowie dem Schweregrad der CHI. Daraus schlossen die Autoren, dass HCY wahrscheinlich das pathogene Agens darstellt. Diese Schlussfolgerung wird durch die hier gewonnenen tierexperimentellen Daten unterstützt. Bei hochnormalen Vitaminspiegeln war eine isolierte HHCY in der Lage, die myokardiale BNP-Expression zu steigern. Bezüglich der Rolle der B-Vitamine im Rahmen der CHI ist die derzeitige Datenlage allerdings noch als unzureichend einzustufen. Mehrere Studien weisen auf negative Auswirkungen von Vitaminmängeln auf die Myokardfunktion hin (49;106). In zwei kürzlich publizierten Interventionsstudien wurde der Einfluss einer Vitamin-Substitution auf die Myokardfunktion bei CHI-Patienten sowie auf die NT-proBNP-Expression bei Gesunden untersucht (48;131). Witte et al. zeigten bei CHI-Patienten eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der Lebensqualität nach einer 9-monatigen Behandlung mit einem Mix diverser Mikronährstoffe, der u.a. Folsäure, Vitamine B6 sowie B12 enthielt. Leider wurden in dieser Studie BNP bzw. NT-proBNP nicht analysiert. Aufgrund der vielen substituierten Komponenten ist es außerdem schwierig den positiven Effekt den B-Vitaminen zuzuschreiben. Herrmann et al. behandelten Herzgesunde ohne KHK über 2 Monate mit verschiedenen Folsäure-Konzentrationen. Dabei ergaben sich keine Änderungen des zirkulierenden

NT-proBNP. Da die meisten Personen sehr niedrige Basiswerte hatten, ist die Übertragbarkeit dieses Befundes auf CHI-Patienten allerdings fraglich. Die Autoren fanden aber in Probanden mit einem erhöhten BNP einen Trend zu niedrigeren NT-proBNP-Spiegel am Ende der Behandlung. Um die Rolle der B-Vitamine besser zu verstehen, sind jedoch weiterführende experimentelle Untersuchungen und Interventionsstudien mit B-Vitaminen notwendig.

Der besondere Wert der mittels der BNP-Messungen erzielten Ergebnisse liegt in den Charakteristika dieses Parameters. Zum einen zeichnet er sich durch eine hohe Sensitivität bei kardialen Dysfunktionen (42;94), insbesondere im frühen Stadium, aus. Zum anderen verfügt er über einen hohen negativen prädiktiven Wert (50;82;97). Darüber hinaus ist die Messung des BNP im Gegensatz zur Echokardiographie frei von subjektiven Einflüssen.

Die BNP-Messungen im Plasma und Myokard werfen die Frage auf, warum die Met-Gruppe keine BNP-Erhöhungen zeigte. Die einfachste Erklärung könnte der signifikant niedrigere HCY-Spiegel in dieser Gruppe sein. Allerdings lag das HCY in dieser Gruppe mit 27,3 $\mu\text{mol/l}$ deutlich (ca. 3-6fach) über dem der Kontrollgruppe. Zumindest bei der BNP-Messung im Myokard hätte sich eine entsprechende Tendenz zeigen sollen. Da dies nicht der Fall war, muss ein anderer Grund vermutet werden. Neben der Höhe des HCY-Spiegels war die Art wie dieser induziert wurde der Hauptunterschied zwischen der Met- und Homo 1%- bzw. 2%-Gruppe. Methionin und HCY führen vermutlich auf völlig unterschiedliche Art und Weise zu einer HHCY. Während es in der Met-Gruppe aufgrund der Methionin-Substitution zu einem massiven Überangebot von Methionin im Methionin-Kreislauf kommt (Substratüberschuss), liegt bei den Homo-Gruppen das genaue Gegenteil, ein Produktüberschuss, vor. Der Substratüberschuss in der Met-Gruppe führt zu einer normalen oder gesteigerten Transmethylierungsaktivität, obwohl HCY erhöht ist. In den Homo-Gruppen hingegen kommt es durch eine Produktinhibition zu einer Reduktion der Transmethylierung. Da eine reduzierte Methylierungsaktivität (Hypomethylierung) einen der am häufigsten diskutierten Pathomechanismen der HHCY darstellt, könnte eine normale bzw. gesteigerte Transmethylierung in der Met-Gruppe eine plausible Erklärung für das Fehlen pathologischer Veränderungen sein.

3 Myokardiales Remodelling

Anhand der BNP-Befunde und vorangegangener Studien aus der Arbeitsgruppe von Joseph und Kennedy (33;55-58) war in den HHCY-Gruppen ein pathologisches Remodelling, gekennzeichnet durch Dilatation, Hypertrophie, vermehrte Einlagerung von perivaskulärem und interstitiellem Kollagen in das Myokard, sowie eine erhöhte Mastzellinfiltration, zu erwarten. Die Resultate der histomorphometrischen Analytik als auch die makroskopischen Befunde (Ventrikel- und Lungenfeuchtgewicht) konnten diese Vermutung aber nicht belegen. Lediglich die Homo 2%-Gruppe zeigte ein erhöhtes Ventrikel- und Lungengewicht. Obwohl die beobachteten Unterschiede von 30% die Messungengenauigkeit von ca. 15% deutlich übertrafen, können diese isolierten Befunde nicht als Beweis für eine Hypertrophie gewertet werden, da die Homo 2%-Gruppe signifikant niedrigere Körpergewichte aufwies. Der Bezug der Organgewichte auf das Körpergewicht soll diese Unterschiede zwar kompensieren, stellt aber nur einen Kunstgriff dar, dessen Validität in einer derartigen Konstellation nicht wirklich gesichert ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Homo 1%-Gruppe, welche ähnlich hohe HCY-Konzentrationen, aber ein im Vergleich zur Kontroll-Gruppe normales Körpergewicht hatte, keine Zunahme des relativen Ventrikel- und Lungengewichtes zeigte. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Organgewichte nur ein relativ grobes Maß für CHI-assoziierte Veränderungen des Herzens sind. Die histomorphometrische Analyse des interstitiellen und perivaskulären Kollagens stellt ein wesentlich präziseres und besser standardisiertes Verfahren dar. In den untersuchten Tieren bewegten sich die Schwankungen innerhalb der Gruppen zwischen 1-3%. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht beobachtet werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die gesteigerte BNP-Expression in den Homo 1%- und 2%-Gruppen nicht von einem pathologischen Remodelling des Myokards begleitet war. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Befunden von Joseph et al. (33;55-57), die nach einer 10 wöchigen Fütterung mit einer 1%-Homo-Diät signifikante Zunahmen um 50-200% beobachteten. Dieser Widerspruch war insofern überraschend, als das in dieser Promotion verwendete Homo 1%-Modell mit dem von Joseph et al. identisch war und kein Rassenunterschied zwischen den Versuchstieren vorlag. Auch die verwendete Analytik war mit der von Joseph et al. verwendeten identisch. Allerdings beinhalteten die HHCY-Gruppen von Joseph et al.

weniger als 10 Tiere. Die hier vorgestellte Arbeit umfasste insgesamt 28 HHcy-Tiere und 17 Kontrollen. Aufgrund dieser großen Anzahl kommt dem Resultat der vorliegenden Studie ein erhebliches Gewicht zu. Derzeit ist noch völlig unklar, wie die Unterschiede zu den Resultaten von Joseph et al. zu erklären sind. Da Joseph et al. ihre Befunde in mehreren Arbeiten bestätigen konnten, gibt es zunächst keinen ersichtlichen Grund an deren Korrektheit zu zweifeln (33;55-57). Allerdings muss eingeräumt werden, dass auch bei Joseph et al. in einer vorherigen Studie mit hypertensiven Ratten die histomorphometrischen Daten das Signifikanzniveau nicht erreichten (58). Dies deutet darauf hin, dass die histomorphometrische Analyse für die Detektion moderater myokardialer Veränderungen ein relativ unsicheres Verfahren darstellt.

Eine weitere histomorphometrische Veränderung im Rahmen der CHI ist eine vermehrte Mastzellinfiltration. Den Mastzellen wird im Rahmen der CHI eine kardioprotektive Funktion zugeschrieben. Joseph et al. zeigten mit Hilfe von Knock-out-Mäusen, bei denen die Mastzellinfiltration unterdrückt war, ein deutlich ausgeprägteres kardiales Remodelling (56). Die kardioprotektive Funktion der Mastzellen ist jedoch nicht unumstritten. So wurden in zwei unabhängigen Studien gegenteilige Befunde erhoben. Im Vergleich mit Mastzell-Defizit Ratten wurde bei den Mastzell-kompetenten Ratten eine vermehrte Fibrosierung und verminderte Ejektionsfraktion beobachtet (17;43). Über die endgültige Funktion der Mastzellen im Rahmen der CHI kann somit nur spekuliert werden. Joseph et al. konnten eine signifikant gesteigerte Mastzellinfiltration in hyperhomocysteinämischen Ratten nachweisen (33;55;57). In der vorliegenden Studie war allerdings kein Unterschied zwischen den Gruppen zu beobachten, was sich homogen in das Bild eines fehlenden kardialen Remodellings einfügt.

Die Diskrepanz zwischen BNP-Expression und kardialem Remodeling ist nicht unbedingt verwunderlich, da BNP im frühen Stadium wahrscheinlich der wesentlich sensitivere Marker für kardiale Veränderungen ist. Diese Vermutung wird durch klinische Studien unterstützt, die BNP- und NT-proBNP-Erhöhrungen bereits bei Patienten mit einer diastolischen Dysfunktion und normaler EF zeigen konnten (24;75;79;134). Auch bei einer milden systolischen Dysfunktion finden sich oft schon erhöhte BNP- und NT-proBNP-Werte (42;67;94). Aufgrund dieser Befunde kann

vermutet werden, dass eine gesteigerte BNP-Sekretion einem kardialen Remodeling vorangeht. Das Herz wird in modernen Konzepten als multifunktionelles und interaktives Organ angesehen, das Teil eines komplexen Netzwerkes ist (27;109). So besitzt BNP nicht nur eine Indikatorfunktion für myokardiale Veränderungen, sondern auch antifibrotische und zytoprotektive Eigenschaften (9;31;60;107). Es liegt auf der Hand, dass solche gegenregulatorischen Effekte des BNP wahrscheinlich vor dem Eintreten morphologischer Veränderungen des Myokards auftreten und BNP als myokardiales Sekretionsprodukt somit sowohl im Plasma als auch im Myokard bereits frühzeitig in erhöhter Menge vorliegen kann. Zur Bestätigung dieser Hypothese, wurden die bereits erwähnten Superfusionsversuche durchgeführt. Diese Versuche lieferten einen klaren Hinweis für eine Kausalität zwischen HCY-Konzentration und BNP-Expression.

4. Limitationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind natürlich mit einigen Limitationen behaftet, die hier etwas eingehender erläutert werden sollen. In der Homo 2%-Gruppe waren die hohen interindividuellen Schwankungen des zirkulierenden HCY auffallend. Insgesamt mussten 3 Homo 2%-Tiere ausgeschlossen werden, da sie keinen Anstieg in der HCY-Plasmakonzentration aufwiesen. Verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe 2 (Ko2), fand sich auch eine signifikant geringere Gewichtszunahme während der Fütterungsperiode. Ursache für die geringere Gewichtszunahme ist wahrscheinlich die verminderte Nahrungsaufnahme in dieser Gruppe, was auf eine eingeschränkte Toleranz der 2%igen Homo-Diät schließen lässt. Dieses Phänomen wurde auch schon von Joseph et al. (58) beschrieben. Auch in deren Studie waren hohe HCY-Werte mit einer verringerten Nahrungsaufnahme und einer verminderten Gewichtszunahme assoziiert. Mit einem Anteil von 2% Hcy in der Standarddiät scheint somit für die Tiere die Grenze der peroral applizierbaren Homocystinmenge erreicht zu sein. Ausgeschlossen wurden ebenso zwei Kontrolltiere, die leicht erhöhte HCY-Werte aufwiesen. Dafür kommen drei Möglichkeiten in Betracht. Da die Vitaminkonzentrationen überproportional hoch

waren und die Kreatininwerte im Normbereich lagen, kommt nur eine Mutation und damit Defekt der Enzyme im Methionin-Stoffwechsel in Frage.

Die geringe Anzahl von Tieren mit positiven BNP-Spiegeln im Plasma war ein weiterer Schwachpunkt der vorliegenden Studie. Ursächlich für dieses Phänomen ist die limitierte Sensitivität der derzeit verfügbaren Ratten-BNP-Assays, bei denen gerade im Normbereich präzise Messungen nicht möglich sind. Aufgrund der geringen Sensitivität des verwendeten BNP-Assays war es damit nicht möglich, potentielle Veränderungen des BNP unterhalb der Nachweisgrenze zu erfassen, was sowohl die gesamte Kontroll-Gruppe als auch den überwiegenden Teil der HHCY-Gruppen betraf. Außerdem ist aufgrund dieser Problematik eine valide Definition des Referenzbereiches für das Ratten-BNP im Plasma nicht möglich. Aufgrund dieser technischen Probleme wurde daher zusätzlich das BNP im Myokardgewebe bestimmt, was sich aufgrund der gut messbaren Konzentration als wesentlich geeigneter erwies.

Die Bestimmung des Ventrikelgewichtes war ebenfalls mit erheblichen Schwierigkeiten behaftet. Das Herz beinhaltete nach Abtrennung vom Blutkreislauf unterschiedlich viel Blut in den Kammern, wodurch Schwankungen von über 60% entstanden. Selbst das Durchspülen des linken Ventrikels mit PBS erwies sich als nicht hilfreich, da statt des Blutes die Spüllösung eingeschlossen wurde. Um diese Unzulänglichkeit zu umgehen, wurde der linke Ventrikel freipräpariert und anschließend in 4 gleichgroße Stücke geteilt. Das adhärente Blut wurde vor dem Wiegen vollständig abgespült. Zur Bestimmung des Gewichts des linken Ventrikels wurden dann alle 4 Aliquote auf die Waagschale gelegt. Durch diese Methode ließ sich die bestmögliche Reproduzierbarkeit erzielen. Trotz dieses standardisierten Vorgehens, sind gewisse Schwankungen, bedingt durch die Präparation, jedoch unvermeidbar.

Ein weiterer Einflussfaktor bezüglich der histomorphometrischen Ergebnisse ist das Auftreten von Schrumpfungartefakten bei der Herstellung der histologischen Präparate. Diese führten in einigen Bereichen zu kleineren Spalträumen zwischen den Zellverbänden, was unter Umständen zur Unterschätzung des Kollagenanteils führen kann. Da jedoch eine große Zahl von Gesichtsfelder pro Präparat analysiert wurde, hatten diese Artefakte wahrscheinlich keinen relevanten Einfluss auf die Ergebnisse.

5 Pathomechanismen

Die hier vorgestellten Ergebnisse und die von Joseph und Kennedy publizierten Daten legen eine relevante Rolle der HHCY bei der Genese der CHI nahe. Die zu Grunde liegenden Pathomechanismen (s. Abbildung 16) sind jedoch noch weitgehend ungeklärt und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Aus zahlreichen klinischen und experimentellen Studien, die im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, wie z.B. KHK, Schlaganfall und Demenz durchgeführt wurden, sind jedoch bereits eine Vielzahl potenzieller Mechanismen bekannt. Dabei sind insbesondere Atherosklerose (101;102), oxidativer Stress (62;111) und Apoptose (124;130) als wesentliche Pathomechanismen der HHCY zu nennen. Vaskulopathie, oxidativer Stress und Apoptose sind aber auch wesentliche Pathomechanismen der CHI. Damit liegt die Vermutung nahe, dass diese Mechanismen auch eine Rolle für den Zusammenhang zwischen HHCY und CHI spielen.

Es wird angenommen, dass die Zunahme von oxidativen Stress im Herz eine wesentliche Komponente in der Pathogenese der Herzinsuffizienz darstellt. Neben tierexperimentellen Studien (8;111) zeigen auch mehrere klinische Arbeiten eine Assoziation der CHI mit vermehrtem oxidativen Stress (5;35;62;80;112;115;136). Die Induktion von oxidativem Stress durch die Verminderung der NO-Verfügbarkeit und einer gesteigerten Sauerstoffradikalbildung ist vermutlich der primär pathologische Prozess im Rahmen der HHCY-induzierten CHI. Tyagi et al. (121) zeigten in einer Zellkulturstudie eine HCY-abhängige Verminderung des Stickstoffmonoxid (NO). Ursächlich dafür war eine HCY-bedingte Reduktion der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) -Expression, einem Inhibitor des asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA). ADMA wiederum inhibiert die NO-Synthase und war in erhöhter Menge messbar. Da verschiedene Studien bereits eine Überproduktion von Superoxid und Peroxynitrit, zwei potenten Oxidantien, bei Abnahme des NO nachgewiesen haben (19;110;121), ist bei HHCY von einer gesteigerten oxidativen Belastung auszugehen. In einer Nachfolgestudie konnten Tyagi et al. nachweisen, dass NO auch an der Regulation des kardialen Remodelings beteiligt ist und ein wichtiges antihypertrophes Agens darstellt (122). Klinische Studien an Patienten mit KHK, instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt unterstützen die

Vermutung, das NO antihypertroph wirkt (22;86;129). Die vermehrte oxidative Belastung führt in der Folge zur Ablagerung oxidierten LDL-Partikel (oxLDL) in den Gefäßwänden, die dann von Makrophagen aufgenommen werden und zur Schaumzellbildung führen (26;39). Als Folge kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die mit einem überschießenden Wachstum der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und der Bildung von extrazellulärer Matrix einhergeht, die schließlich verkalkt. Dies führt letztendlich zur Entstehung atherosklerotischer Plaques. Die Konsequenz ist eine Koronarsklerose mit verminderter Perfusion und einer eingeschränkten Funktion des Myokards.

Ein weiterer potentieller Pathomechanismus könnte eine vermehrte Apoptoserate sein. Mehrere Studien konnten die Induktion einer erhöhten Apoptoseaktivität in Endothelzellen durch HCY zeigen (118;122). Tyagi et al. führte dies in seinem Zellkulturversuch auf ein gestörtes transmembranöses Potential der Mitochondrien zurück, welches durch eine HCY-induzierte vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen wird. Durch das gestörte Potential wurde Cytochrom c freigesetzt, welches eine Reihe von Kaspasen aktiviert und damit den programmierten Zelltod einführt (122). Zahlreiche Untersuchungen belegen darüber hinaus, dass eine gesteigerte Apoptoserate auch einen wesentlichen Pathomechanismus der CHI und des kardialen Remodellings darstellt (38;44;105;124;130). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass HCY vergleichbar der Situation in Endothelzellen auch die Apoptoserate von Kardiomyozyten erhöht.

Im Rahmen des kardialen Remodellings sind zahlreiche Regulatorproteine beteiligt, unter denen den Metalloproteinasen (MMP) eine zentrale Rolle zukommt. Viele tierexperimentelle (66;68;69;72;73;108;113;114), aber auch klinische Daten (98;100;135), haben den Einfluss von MMP's auf die kardiale Struktur und Funktion des Herzens gezeigt und deren Rolle beim Remodelling des insuffizienten Herzen nachgewiesen. Yamazaki et al. fanden beispielsweise in einer klinischen Studie eine positive Korrelation zwischen der MMP-2 und dem NYHA-Stadium von CHI-Patienten (135). Dabei war eine erhöhte MMP-2-Expression von einem erhöhten Plasma-BNP begleitet. Auch die HHCY induziert eine gesteigerte MMP-Expression. In tierexperimentellen Versuchen (11;87;88) mit hyperhomocysteinämischen Ratten konnte ein signifikanter Anstieg der MMP's in Myokardendothelzellen beobachtet

werden. Darüber hinaus berichtete Moshal et al., dass ein HCY-bedingter Anstieg von Sauerstoffradikalen, über eine mitochondrial getriggerte Reaktions-Kaskade, zu einer Aktivierung von MMP's führt (11;87;89). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass trotz des fehlenden Nachweises in Kardiomyozyten die Vermutung nahe liegt, dass eine HHCY über vermehrten oxidativen Stress zu einer gesteigerten MMP-Expression und konsekutiv zu einem pathologischen kardialen Remodelling führt.

Neben der bisher diskutierten Wirkung ist die HHCY auch ein wichtiger Indikator für eine gestörte Transmethylierungskapazität. HCY ist das Endprodukt des Methioninkreislaufs und entsteht über die Zwischenprodukte S-Adenosyl-Methionin (SAM) und S-Adenosyl-Homocystein (SAH). SAM ist der universelle Methylgruppendonator des Organismus. SAM überträgt seine Methylgruppe im Rahmen der Transmethylierung auf zahlreiche Substrate, die dadurch ihre funktionelle Kompetenz erlangen. Im Rahmen der HHCY kommt es durch eine Produktinhibition zu einer Hypomethylierung, die letztendlich zu einer gestörten Zellhomöostase führt. Daher ist es vorstellbar, dass eine HHCY über eine reduzierte Transmethylierungsaktivität eine pathologisch veränderte extrazelluläre Matrix bedingt und mit einer konsekutiven Störung der Myokardfunktion einhergeht (20;21;45).

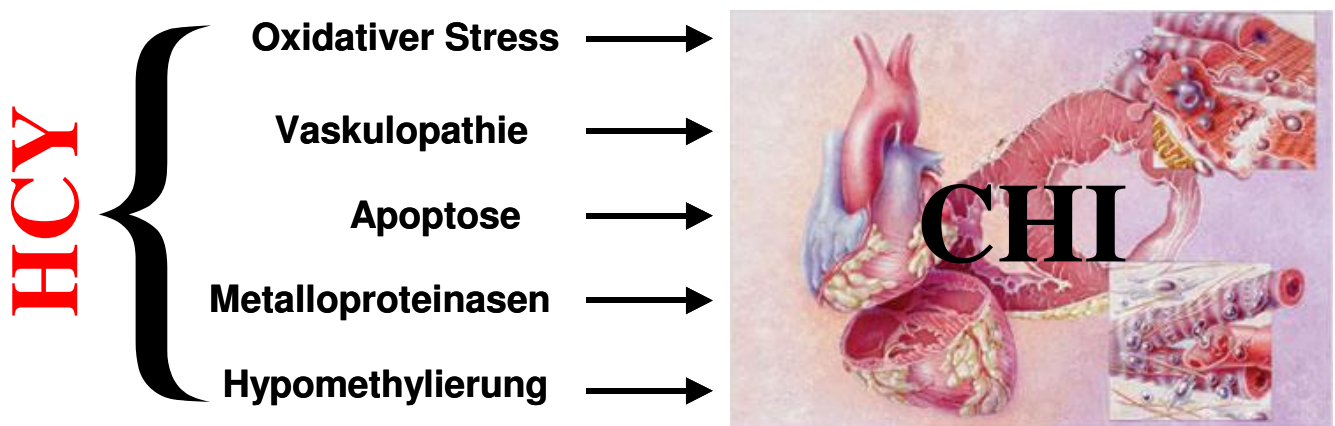


Abbildung 16: Hypothetische Pathobiomechanismen der HCY induzierten CHI.

VI Schlussfolgerung

Aus den im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Daten kann man schlussfolgern, dass eine intermediäre HHCY, verursacht durch eine Homocystin-angereicherte Diät, die kardiale BNP-Expression in Ratten stimuliert. Dieser BNP-Anstieg wird allerdings nicht von einem pathologischen Remodelling begleitet. Folglich ist davon auszugehen, dass die erhöhte BNP-Expression in hyperhomocysteinämischen Ratten wahrscheinlich sehr frühe pathogene Effekte der HHCY am Myokard reflektiert. Die vorliegenden Befunde unterstreichen darüber hinaus die potentielle Rolle des BNP als frühen und sensitiven Marker für myokardiale Veränderungen.

VII. Literaturverzeichnis

1. Studies of left ventricular dysfunction (SOLVD)--rationale, design and methods: two trials that evaluate the effect of enalapril in patients with reduced ejection fraction. *Am J Cardiol* 1990;66:315-22.
2. Askew EW. Environmental and physical stress and nutrient requirements. *Am J Clin Nutr* 1995;61:631S-7S.
3. Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res* 2004;94:28-36.
4. Au-Yeung KK, Yip JC, Siow YL, O K. Folic acid inhibits homocysteine-induced superoxide anion production and nuclear factor kappa B activation in macrophages. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84:141-7.
5. az-Velez CR, Garcia-Castineiras S, Mendoza-Ramos E, Hernandez-Lopez E. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:146-52.
6. Baer F.M. EE. The clinical manifestation and relevance of diastolic dysfunction. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*, 1999:213-9.
7. Baker DW, Einstadter D, Thomas C, Cebul RD. Mortality trends for 23,505 Medicare patients hospitalized with heart failure in Northeast Ohio, 1991 to 1997. *Am Heart J* 2003;146:258-64.
8. Ball AM, Sole MJ. Oxidative stress and the pathogenesis of heart failure. *Cardiol Clin* 1998;16:665-ix.
9. Baxter GF. The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol* 2004;99:71-5.
10. Beguin M, Houpe D, Peltier M, Chapelain K, Lesbre JP, Tribouilloy C. [Epidemiology and aetiology of cardiac failure in the Somme]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97:113-9.
11. Bescond A, Augier T, Chareyre C, Garcon D, Hornebeck W, Charpiot P. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:498-503.
12. Bibbins-Domingo K, Gupta R, Na B, Wu AH, Schiller NB, Whooley MA. N-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide (NT-proBNP), cardiovascular events, and mortality in patients with stable coronary heart disease. *JAMA* 2007;297:169-76.
13. Blacher J, Demuth K, Guerin AP, Vadez C, Moatti N, Safar ME, London GM. Association between plasma homocysteine concentrations and cardiac hypertrophy in end-stage renal disease. *J Nephrol* 1999;12:248-55.

14. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC et al. Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999;159:38-44.
15. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
16. Braunwald E, FRAHM CJ, ROSS J, Jr. Studies on Starling's law of the heart. V. Left ventricular function in man. *J Clin Invest* 1961;40:1882-90.
17. Brower GL, Janicki JS. Pharmacologic inhibition of mast cell degranulation prevents left ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. *J Card Fail* 2005;11:548-56.
18. Burlew BS, Weber KT. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 2002;27:92-8.
19. Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, Shah AM. Oxidative stress and heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2003;96:214-21.
20. Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EE, Clode N et al. Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med* 2005;83:831-6.
21. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* 2003;49:1292-6.
22. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C et al. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001;47:887-92.
23. Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, de SA, Oliveira A. Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur J Heart Fail* 2002;4:531-9.
24. Celinski R, Cholewinski W, Stefaniak B, Tarkowska A. Relationship between plasma BNP levels and left ventricular diastolic function as measured by radionuclide ventriculography in patients with coronary artery disease. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2004;7:123-8.
25. Cesari M, Zanchetta M, Burlina A, Pedon L, Maiolino G, Sticchi D et al. Hyperhomocysteinemia is inversely related with left ventricular ejection fraction and predicts cardiovascular mortality in high-risk coronary artery disease hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:115-21.
26. Chandrashekhar Y. Role of apoptosis in ventricular remodeling. *Curr Heart Fail Rep* 2005;2:18-22.
27. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H17-H29.

28. Cooke GE, Eaton GM, Whitby G, Kennedy RA, Binkley PF, Moeschberger ML, Leier CV. Plasma atherogenic markers in congestive heart failure and posttransplant (heart) patients. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:509-16.
29. Corteville DC, Bibbins-Domingo K, Wu AH, Ali S, Schiller NB, Whooley MA. N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide as a diagnostic test for ventricular dysfunction in patients with coronary disease: data from the heart and soul study. *Arch Intern Med* 2007;167:483-9.
30. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:208-25.
31. D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004;101:113-29.
32. Davies M, Hobbs F, Davis R, Kenkre J, Roalfe AK, Hare R et al. Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study. *Lancet* 2001;358:439-44.
33. Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Melchert RB, Joseph J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:75-82.
34. Di LA, Goliani P, Grella M, Sabbadini G, Driussi M, Sinagra G. [Hospital statistics as tool in epidemiologic studies: heart failure in Trieste]. *Ital Heart J Suppl* 2002;3:58-70.
35. Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R et al. Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiológicos Latinoamerica) Collaborative Group. *Circulation* 1998;98:2227-34.
36. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-72.
37. Fonarow GC, Corday E. Overview of acutely decompensated congestive heart failure (ADHF): a report from the ADHERE registry. *Heart Fail Rev* 2004;9:179-85.
38. Foo RS, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 2005;115:565-71.
39. Garg S, Narula J, Chandrashekhar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:73-9.
40. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
41. Gustafsson F, Torp-Pedersen C, Brendorp B, Seibaek M, Burchardt H, Kober L. Long-term survival in patients hospitalized with congestive heart failure:

relation to preserved and reduced left ventricular systolic function. Eur Heart J 2003;24:863-70.

42. Hammerer-Lercher A, Ludwig W, Falkensammer G, Muller S, Neubauer E, Puschendorf B et al. Natriuretic peptides as markers of mild forms of left ventricular dysfunction: effects of assays on diagnostic performance of markers. Clin Chem 2004;50:1174-83.
43. Hara M, Ono K, Hwang MW, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K et al. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. J Exp Med 2002;195:375-81.
44. Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Shirani J, Brown JH, Dorn GW et al. Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of $\alpha(q)$ transgenic mice. Circulation 2003;108:3036-41.
45. Hermes M, Osswald H, Mattar J, Kloor D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. Exp Cell Res 2004;294:325-34.
46. Herold G.und Mitarbeiter. *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln: 2005:171-175pp.
47. Herrmann M, Kindermann I, Muller S, Georg T, Kindermann M, Bohm M, Herrmann W. Relationship of plasma homocysteine with the severity of chronic heart failure. Clin Chem 2005;51:1512-5.
48. Herrmann, M., Taban-Shomal, O., Pexa, A., Kilter, H., Umanskaya, N., Straub, R. H., Böhm, M., and Herrmann, W. Hyperhomocysteinemia and myocardial expression of brain natriuretic peptide in rats. Int J Cardiol im Druck. 200. Ref Type: In Press
49. Herzlich BC, Lichstein E, Schulhoff N, Weinstock M, Pagala M, Ravindran K et al. Relationship among homocyst(e)ine, vitamin B-12 and cardiac disease in the elderly: association between vitamin B-12 deficiency and decreased left ventricular ejection fraction. J Nutr 1996;126:1249S-53S.
50. Hobbs FD, Davis RC, Roalfe AK, Hare R, Davies MK. Reliability of N-terminal proBNP assay in diagnosis of left ventricular systolic dysfunction within representative and high risk populations. Heart 2004;90:866-70.
51. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A et al. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. Z Kardiol 2005;94:488-509.
52. Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. Life Sci 2001;68:2799-811.
53. Jeron A, Kaiser T, Straub RH, Weil J, Riegger GA, Muders F. Myocardial IL-6 regulation by neurohormones--an in vitro superfusion study. Brain Behav Immun 2003;17:245-50.

54. Jong P, Vowinckel E, Liu PP, Gong Y, Tu JV. Prognosis and determinants of survival in patients newly hospitalized for heart failure: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002;162:1689-94.
55. Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Melchert RB et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H679-H686.
56. Joseph J, Kennedy RH, Devi S, Wang J, Joseph L, Hauer-Jensen M. Protective role of mast cells in homocysteine-induced cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2541-H2545.
57. Joseph J, Washington A, Joseph L, Kennedy RH. Hyperhomocysteinaemia-induced atrial remodelling in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:331-7.
58. Joseph J, Washington A, Joseph L, Koehler L, Fink LM, Hauer-Jensen M, Kennedy RH. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2567-H2574.
59. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:167-73.
60. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT et al. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 2004;94:453-61.
61. Kasper D.L. BEFASHSLLSLJLL. *Harrisons Innere Medizin*, 16.Auflage Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit dem Charité ed. 2004:1462-1468pp.
62. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1352-6.
63. Kenchaiah S, Narula J, Vasan RS. Risk factors for heart failure. *Med Clin North Am* 2004;88:1145-72.
64. Kennedy RH, Owings R, Joseph J, Melchert RB, Hauer-Jensen M, Boerma M. Acute dilatory and negative inotropic effects of homocysteine are inhibited by an adenosine blocker. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:340-4.
65. Kennedy RH, Owings R, Shekhawat N, Joseph J. Acute negative inotropic effects of homocysteine are mediated via the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H812-H817.
66. Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:202-5.
67. Lee SC, Stevens TL, Sandberg SM, Heublein DM, Nelson SM, Jougasaki M et al. The potential of brain natriuretic peptide as a biomarker for New York Heart

Association class during the outpatient treatment of heart failure. *J Card Fail* 2002;8:149-54.

68. Li YY, Feldman AM. Matrix metalloproteinases in the progression of heart failure: potential therapeutic implications. *Drugs* 2001;61:1239-52.
69. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000;46:214-24.
70. Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1999;104:1603-12.
71. Liang YJ, Lai LP, Wang BW, Juang SJ, Chang CM, Leu JG, Shyu KG. Mechanical stress enhances serotonin 2B receptor modulating brain natriuretic peptide through nuclear factor-kappaB in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2006;72:303-12.
72. Lindsey M, Lee RT. MMP inhibition as a potential therapeutic strategy for CHF. *Drug News Perspect* 2000;13:350-4.
73. Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L et al. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation* 2002;105:753-8.
74. Lowery SL, Massaro R, Yancy CW, Jr. Advances in the management of acute and chronic decompensated heart failure. *Lippincotts Case Manag* 2004;9:S1-15.
75. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R et al. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002;105:595-601.
76. MacCarthy PA, Kearney MT, Nolan J, Lee AJ, Prescott RJ, Shah AM et al. Prognosis in heart failure with preserved left ventricular systolic function: prospective cohort study. *BMJ* 2003;327:78-9.
77. MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A et al. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation* 2000;102:1126-31.
78. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998;135:825-32.
79. Mak GS, DeMaria A, Clopton P, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide in the evaluation of left ventricular diastolic function: comparison with tissue Doppler imaging recordings. *Am Heart J* 2004;148:895-902.

80. Mallat Z, Philip I, Lebrete M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998;97:1536-9.
81. McCullough PA, Omland T, Maisel AS. B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians. *Rev Cardiovasc Med* 2003;4:72-80.
82. McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrandt P, Dargie HJ. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail* 2004;6:269-73.
83. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000;83:596-602.
84. Mejhert M, Persson H, Edner M, Kahan T. Epidemiology of heart failure in Sweden--a national survey. *Eur J Heart Fail* 2001;3:97-103.
85. Miller LE, Grifka J, Scholmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:427-35.
86. Moselhy SS, Demerdash SH. Plasma homocysteine and oxidative stress in cardiovascular disease. *Dis Markers* 2003;19:27-31.
87. Moshal KS, Sen U, Tyagi N, Henderson B, Steed M, Ovechkin AV, Tyagi SC. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C883-C891.
88. Moshal KS, Singh M, Sen U, Rosenberger DS, Henderson BC, Tyagi N et al. Homocysteine-mediated activation and mitochondrial translocation of calpain regulates MMP-9 in MVEC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006.
89. Moshal KS, Singh M, Sen U, Rosenberger DS, Henderson BC, Tyagi N et al. Homocysteine-mediated activation and mitochondrial translocation of calpain regulates MMP-9 in MVEC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006.
90. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000;39:13005-11.
91. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 1999;20:447-55.
92. Muders F, Kromer EP, Griesse DP, Pfeifer M, Hense HW, Riegger GA, Elsner D. Evaluation of plasma natriuretic peptides as markers for left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1997;134:442-9.
93. Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P et al. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med* 2004;350:647-54.

94. Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Capability of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP as indicators of cardiac structural disease in asymptomatic patients with systemic arterial hypertension. *Clin Chem* 2005;51:2245-51.
95. Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995;96:1280-7.
96. Nallamothu BK, Fendrick AM, Omenn GS. Homocyst(e)ine and coronary heart disease: pharmacoeconomic support for interventions to lower hyperhomocyst(e)inaemia. *Pharmacoeconomics* 2002;20:429-42.
97. Nielsen LS, Svanegaard J, Klitgaard NA, Egeblad H. N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea. *Eur J Heart Fail* 2004;6:63-70.
98. Nishikawa N, Yamamoto K, Sakata Y, Mano T, Yoshida J, Miwa T et al. Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res* 2003;57:766-74.
99. O'Connell JB, Bristow MR. Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:S107-S112.
100. Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1609-18.
101. Purek L, Laule-Kilian K, Christ A, Klima T, Pfisterer ME, Perruchoud AP, Mueller C. Coronary artery disease and outcome in acute congestive heart failure. *Heart* 2006;92:598-602.
102. Remme WJ. Overview of the relationship between ischemia and congestive heart failure. *Clin Cardiol* 2000;23:IV4-IV8.
103. Remme WJ, McMurray JJ, Rauch B, Zannad F, Keukelaar K, Cohen-Solal A et al. Public awareness of heart failure in Europe: first results from SHAPE. *Eur Heart J* 2005;26:2413-21.
104. Renz-Polster H. KSBJ. Basislehrbuch Inneren Medizin, 3.Auflage ed. 2004:86-93pp.
105. Rivera DM, Lowes BD. Molecular remodeling in the failing human heart. *Curr Heart Fail Rep* 2005;2:5-9.
106. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004;292:344-50.

107. Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res* 2003;57:515-22.
108. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M et al. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation* 2004;109:2143-9.
109. Schulze CP, Gielen S, Adams V, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Bas Res Cardiol* 2006;98:267-74.
110. Searles CD. The nitric oxide pathway and oxidative stress in heart failure. *Congest Heart Fail* 2002;8:142-7, 155.
111. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998;40:426-32.
112. Sobotka PA, Gupta DK, Lansky DM, Costanzo MR, Zarling EJ. Breath pentane is a marker of acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:224-9.
113. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000;46:225-38.
114. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000;102:1944-9.
115. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol* 2004;93:439-53.
116. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. DACH-LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B Vitamins in Cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1392-403.
117. Stewart S, Macintyre K, Capewell S, McMurray JJ. Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 2003;89:49-53.
118. Suhara T, Fukuo K, Yasuda O, Tsubakimoto M, Takemura Y, Kawamoto H et al. Homocysteine enhances endothelial apoptosis via upregulation of Fas-mediated pathways. *Hypertension* 2004;43:1208-13.
119. Sundstrom J, Sullivan L, Selhub J, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Jacques PF et al. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study. *Eur Heart J* 2004;25:523-30.

120. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D et al. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1997;96:509-16.
121. Tyagi N, Collins K, Steed MM, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of Homocysteine-Induced Oxidative Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;..
122. Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Moshal KS, Tyagi SC. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* 2006;..
123. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-32.
124. van E, V, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 2005;67:21-9.
125. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA* 2003;289:1251-7.
126. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism* 2001;50:1466-71.
127. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. *Metabolism* 2000;49:225-8.
128. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202.
129. Wang G, Mao JM, Wang X, Zhang FC. Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1650-4.
130. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003;111:1497-504.
131. Witte KK, Clark AL, Cleland JG. Chronic heart failure and micronutrients. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1765-74.
132. Wocial B, Berent H, Kostrubiec M, Kuczyńska K, Kuch-Wocial A, Nieweglowska N. Homocysteine, adrenergic activity and left ventricular mass in patients with essential hypertension. *Blood Press* 2002;11:201-5.
133. Woo CW, Siow YL, O K. Homocysteine activates cAMP-response element binding protein in HepG2 through cAMP/PKA signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1043-50.

134. Yamaguchi H, Yoshida J, Yamamoto K, Sakata Y, Mano T, Akehi N et al. Elevation of plasma brain natriuretic peptide is a hallmark of diastolic heart failure independent of ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:55-60.
135. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;6:41-5.
136. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Senes M et al. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998;44:148-54.
137. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.
138. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* 2002;105:1387-93.

VIII Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
5-Methyl-THF	5-Methyltetrahydrofolat
5,10-Methylen-THF	5-Methyltetrahydrofolat
ADH	antidiuretisches Hormon
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AHA	American Heart Association
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bzw.	beziehungsweise
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CHI	Chronische Herzinsuffizienz
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
dl	Deziliter
EF	Ejektionsfraktion
ERC	European Society of Cardiology
HCY	Homocystein
HHCY	Hyperhomocysteinämie
HI	Herzinsuffizienz
Homo	Homocystin
Homo 1%	Homocystin 1%-Gruppe
Homo 2%	Homocystin 2%-Gruppe
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
IH	mittelgradige HHCY
Kcal	Kilokalorie
KHK	Koronare Herzkrankheit
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

Ko1/2	Kontrollgruppe 1 bzw. 2
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer-enddiastolischer Druck
LVMl	linksventrikulärer Massen-Index
Met	Methionin-Gruppe
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Metalloproteinase
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide serum level
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate buffered saline
pg	Pikogramm
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SD	Standardabweichung
SH	schwere HHCY
SHR	spontan hypertensive Ratten
s.	siehe
s.u.	siehe unten
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vs.	Versus
z.B.	zum Beispiel

IX Eigene Publikationen

1. Herrmann M, Taban-Shomal O, Muller S, Gunter L, Hubner U, Bohm M, Herrmann W. Hyperhomocysteinemia--the biochemical link between a weak heart and brittle bones? Clin Lab. 2006;52(3-4):137-47.
2. Herrmann M, Taban-Shomal O, Hubner U, Bohm M, Herrmann W. A review of homocysteine and heart failure. Eur J Heart Fail. 2006 Oct;8(6):571-6.
3. Herrmann M, Taban-Shomal O, Pexa A, Kilter H, Umanskaya N, Straub RH, Böhm M, and Herrmann W. Hyperhomocysteinemia and myocardial expression of brain natriuretic peptide in rats. Int J Cardiol im Druck. 200. Ref Type: In Press.
4. Das vorliegende Forschungsprojekt wurde an der 36. Jahrestagung des Arbeitskreises "Klinischer Lipidstoffwechsel" in Maikammer 2006 vorgetragen

X Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. W. Herrmann für die Überlassung des Themas sowie der Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. med. M. Herrmann für die Hilfe bei den praktischen Arbeiten sowie bei der Datenanalyse und dem Schreiben der vorliegenden Arbeit. Auch möchte ich mich für die Grillabende und die Motivation zum Sport bedanken.

Weiterhin gilt mein großer Dank Dr. med. U. Hübner für die geduldige Assistenz bei allen invasiven Eingriffen, den selbst meine „Marathon“-Aktionen nicht aus der Ruhe brachten, für den regen Gedankenaustausch und für die Regelung der Bestellungen.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Zentrallabor Homburg für ihre Hilfsbereitschaft. Vor allem aber gilt der Dank Frau Sand-Hill, Frau Bodis und Herr Kraus und Herr Knapp, deren flexibler Einsatz ein Segen für jeden in Zeitnot stehenden Doktoranten ist, als auch ein großer Dank Natascha Umanskaya gilt für ihr Hilfe zur Beendigung des Forschungsprojektes. Und ich danke Frau Druck, ohne ihrer Hilfe mir der Zugang zum Zentrallabor immer verwehrt geblieben wäre.

Ohne die Hilfe von Frau Mink aus der Rechtsmedizin Homburg hätten die histologischen Präparate nie die vorliegende gute Qualität erzielt. Ebenso gebührt der Dank Herrn Doktor Glasen für die diversen Anregungen und Prof. Dr. med. J. Wilske, der die histologischen Arbeiten in seinem Haus ermöglichte. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. med. Rainer H. Straub für die Zusammenarbeit im Rahmen der Superfusionsversuche.

Danken möchte ich auch Dr. Kilter für die echokardiographische Untersuchung der Ratten, sowie Frau Seeland für die Beurteilung der histologischen Präparate, vor allem Prof. Dr. Michael Böhm, der uns bei der Aufstellung der Projekte mit Rat und Tat unterstützte.

Gedankt sei Prof. Dr. Michael Menger für die zur Verfügung gestellten Instrumente und den Tierpflegern der experimentellen Chirurgie für ihre Geduld. Auch sei der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. M. Frings gedankt für ihren geduldigen Rat.

Mein größter Dank aber gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Sie sind mir Vorbild und Verpflichtung und verdienen den größten Respekt.

XI Lebenslauf

Persönliche Daten

Omid Taban-Shomal
04.06.1983 in Homburg geboren
Adresse: Schulstrasse 15, 66130 Saarbrücken

Familienstand: ledig

Schulausbildung

01.09.1993-31.08.2002 Deutsch-Französisches-Gymnasium in Saarbrücken,
Abschluss mit dem Abitur
04/2001-05/2001 Vorpraktikum im Klinikum Saarbrücken

Studium

09/2002 Immatrikulation ins Studium der Humanmedizin an der
Universität Homburg
09/2004 Physikumsabschluss mit dem Gesamtprädikat „gut“ und
Beginn der Promotionsarbeit
02/2007 Abschluss des 5. klinischen
Semesters

Famulaturen Abteilung für Anästhesie im Evangelischen Krankenhaus
Saarbrücken
Abteilung für klinische Geriatrie in der DRK-Klinik Mettlach
Radiologische Abteilung an der Universitätsklinik Homburg

Praktische Tätigkeiten

Schwimmtrainer im TV- Fechingen
Forschungsbetreuung im Zentrallabor Homburg
Sitzwächter in Intensivstationen der Universitätsklinik
Homburg

Kenntnisse/Interessen

Fremdsprachen

Gute Französisch-, Englisch- und Persisch- Kenntnisse

Interessen

Ausdauersport, Klavier

XII Anhang